

**Die Leber als Latenzort des murinen  
Cytomegalovirus: Identifizierung und  
Charakterisierung des latent infizierten Zelltyps**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

Christof Seckert  
geb. am 11.12.1973 in Mainz

Mainz, im September 2007

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2007

## Zusammenfassung

Die Untersuchungen der murinen Cytomegalovirus (mCMV) Infektion im BALB/c Mausmodell konzentrierten sich bislang auf die Lunge, da diese einen Hauptort der mCMV Latenz darstellt. Da latentes CMV auch häufig durch Lebertransplantationen übertragen wird, wurde in dieser Arbeit die Leber als ein weiteres medizinisch relevantes Organ der CMV Latenz und Reaktivierung untersucht. Um zunächst die zellulären Orte der mCMV Latenz in der Leber zu ermitteln, wurden verschiedengeschlechtliche Knochenmarktransplantationen (KMT) mit männlichen *tdy*-positiven Spendern und weiblichen, *tdy*-negativen Empfängern, mit anschließender mCMV Infektion durchgeführt, um latent infizierte Mäuse mit geschlechtschromosomalem Chimärismus zu generieren. Diese Chimären erlaubten eine Unterscheidung zwischen *tdy*-positiven Zellen hämatopoetischen Ursprungs und *tdy*-negativen stromalen und parenchymalen Gewebszellen.

Die Separation von Leberzellen der Chimären mittels zentrifugaler Elutriation und anschließender DNA Quantifizierung viraler und zellulärer Genome durch eine quantitative *real-time* PCR ergab einen ersten Hinweis, dass Endothelzellen ein zellulärer Ort der mCMV Latenz sind. Die darauf folgende immunomagnetische Zelltrennung lokalisierte latente virale DNA in der CD31-positiven Zellfraktion. Die Koexpression von CD31 mit dem endothelzellspezifischen Oberflächenmarker ME-9F1 identifizierte die sinusoidalen Endothelzellen der Leber (LSEC) als die Zellen, die latente virale DNA beherbergen. In den zytofluorometrisch aufgereinigten CD31<sup>+</sup>/ME-9F1<sup>+</sup> LSEC waren bei gleichzeitigem Rückgang der männlichen *tdy* Markergene virale Genome angereichert, was darauf hinwies, dass Zellen, die virale DNA enthalten, vom Knochenmark-Empfänger stammen. Durch zytofluorometrische Analysen isolierter LSEC konnte eine vom Spender abstammende Subpopulation MHCII<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> LSEC identifiziert werden. Anschließende Quantifizierungen viraler DNA aus latent infizierten Mäusen detektierten eine Abnahme viraler Genome mit zunehmender Menge an *tdy*-positiven Zellen, was beweist, dass MHCII<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> LSEC keinen Ort der mCMV Latenz darstellen. Die *limiting dilution* Untersuchungen der isolierten latent infizierten LSEC ergaben eine Frequenz von einer latent infizierten Zelle unter  $\sim 1,9 \times 10^4$  LSEC und eine Anzahl von 7 bis 19 viralen Genomen pro latent infizierter Zelle.

Nach 24 Stunden Kultivierung der LSEC konnte mittels quantitativer *real-time* RT-PCR mit Gesamt-RNA aus LSEC ein Anstieg der Genexpression der *immediate early* Gene *ie1* und *ie3* sowie eine Induktion des *early* Gens *e1* gezeigt werden. Eine Erhöhung der transkriptionellen Reaktivierung durch die Inkubation der LSEC mit unterschiedlichen HDAC Inhibitoren konnte allerdings nicht erzielt werden, da sowohl die Menge der isolierten RNA aus behandelten Kulturen, als auch die Anzahl viraler Transkripte im Vergleich zu den unbehandelten Kulturen erniedrigt war.

Aufgrund der kurzen Lebensdauer isolierter LSEC *in vitro* konnte durch Kokultivierungen latent infizierter LSEC zusammen mit murinen embryonalen Fibroblasten keine Virusreaktivierung induziert werden. Im Gegensatz dazu wurden durch den Transfer gereinigter ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> LSEC aus latent infizierten Spendern in immunsupprimierte Empfänger virale Rekurrenzen in Lungenexplantatkulturen des Rezipienten detektiert. Damit konnten LSEC eindeutig als zellulärer Ort von mCMV Latenz und Reaktivierung in der Leber identifiziert werden.

## Summary

Studies in a BALB/c mouse model of murine cytomegalovirus (mCMV) infection were so far focussed on the lungs as a recognized major organ site of latency. As latent CMV is frequently transmitted also by liver transplantation, investigation of the liver as another potential medically relevant organ site of CMV latency and reactivation was performed. To identify the cellular site of latent mCMV in the liver, sex-mismatched bone marrow transplantations (BMT) with male *tdy*-positive donors and female *tdy*-negative recipients receiving an mCMV infection after BMT were performed to generate latently infected sex chromosome chimeras. These sex-mismatched chimeras allow a discrimination between *tdy*-positive cells of hematopoietic lineages and *tdy*-negative stromal and parenchymal tissue cells.

Separation of liver cells by centrifugal elutriation followed by viral and cellular DNA quantification with quantitative real-time PCR gave a first hint to suggest endothelial cells (EC) as a cellular site of mCMV latency in the liver. Subsequent positive immunomagnetic cell sorting localized latent viral DNA in a CD31-positive cell fraction. Coexpression of CD31 and the endothelial cell type-specific surface marker ME-9F1 identified liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) as cells harbouring latent viral DNA. Specifically, viral genomes were found to be enriched in sort-purified CD31<sup>+</sup>/ME-9F1<sup>+</sup> LSEC concomitant with a loss of the male marker gene *tdy*, indicating that cells containing viral DNA are recipient-derived. FACS analysis of isolated LSEC from latently infected mice revealed a donor derived subpopulation of MHCII<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> LSEC. Subsequent quantification of viral DNA detected a decreased number of viral genomes in an increased quantity of *tdy*-positive cells, suggesting that MHCII<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> LSEC are not a site of mCMV latency. Limiting dilution assays of isolated latently infected LSEC revealed a frequency of one latently infected cell among  $\sim 1.9 \times 10^4$  LSEC and a latent viral genome copy number of 7 to 19 per latently infected cell.

Quantitative real-time RT-PCR with total RNA from LSEC showed an increased expression of the immediate early genes *ie1* and *ie3* and an induction of the early gene *e1* after 24 hours of LSEC cultivation. However, the application of different HDAC inhibitors to cultured LSEC to induce the enhancement of viral transcriptional reactivation failed, because of a decreased amount of isolated RNA from LSEC and a severe reduction of detectable viral transcripts.

Due to the abbreviated life of isolated LSEC *in vitro*, cocultivation of LSEC from latently infected mice and murine embryonal fibroblasts did not induce any viral reactivation. Finally, transfer of purified ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> LSEC from latently infected donors into  $\gamma$ -irradiated recipients followed by the detection of virus recurrence in organ explant cultures of the lung identified LSEC as a cellular site of mCMV latency and reactivation.

## Abkürzungsverzeichnis

a .....	Jahr
AcLDL.....	Acetyliertes <i>low density lipoprotein</i>
AIDS.....	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
Ak.....	Antikörper
Amp.....	Ampicillin
APC.....	Allophycocyanin
APC.....	Antigenpräsentierende Zelle
<i>Aqua bidest</i> .....	Reinstwasser ( <i>Aqua ad iniectabilia</i> )
ATP.....	Adenosintriphosphat
b .....	Base
β-ME.....	β-Mercaptoethanol
bp.....	Basenpaare
BMT.....	<i>bone marrow transplantation</i>
BSA.....	Bovines Serum Albumin
CaCl <sub>2</sub> .....	Calciumchlorid
CCIC.....	<i>circulating cytomegalic infected cells</i>
CD.....	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA.....	<i>complementary DNA</i>
CIP.....	<i>calf intestinal phosphatase</i>
cm.....	Zentimeter
CMV.....	Cytomegalovirus
CO <sub>2</sub> .....	Kohlendioxid
Cs.....	Cäsium
CSF.....	<i>colony stimulating factor</i>
CTL.....	Zytotoxische CD8 T-Lymphozyten
CTP.....	Cytidintriphosphat
d .....	Tag
DB.....	<i>dense body</i>
DC.....	Dendritische Zellen
DEPC.....	Diethylpyrocarbonat
DMEM.....	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF.....	Dimethylformamid
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
dNTP.....	Desoxyribonukleotidtriphosphate
dsDNA.....	Doppelstrang DNA
dTTP.....	Desoxythymidintriphosphat
dUTP.....	Desoxyuridintriphosphat
E/e.....	<i>early</i>
EBV.....	Epstein-Barr Virus
EDTA.....	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR.....	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
EtBr.....	Ethidiumbromid
Ex.....	Exon
FACS.....	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FCS.....	Fetales Kälberserum
FITC.....	Fluoresceinisothiocyanat
for.....	<i>forward</i>
FSC.....	<i>forward scatter</i>

---

g	Gramm
gB	Glykoprotein B
GBSS	<i>Gey's balanced salt solution</i>
GITC	Guanidinisothiocyanat
GM	Granulozyten-Makrophagen
GTP	Guanosintriphosphat
GvH	<i>graft versus host</i>
Gy	Gray
h	Stunde
hCMV	humanes Cytomegalovirus
HDAC	Histondeacetylase
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HHV	Humanes Herpesvirus
H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	Demineralisiertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HSC	<i>hepatic stellate cell</i>
HSPG	Heparansulfat Proteoglykane
HSV	Herpes Simplex Virus
Hz	Hertz
IE/ie	<i>immediate early</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KAc	Kaliumacetat
kbp	Kilobasenpaar
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
KMZ	Knochenmarkzellen
KSHV	Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus
kV	Kilovolt
L/I	<i>late</i>
l	Liter
LAL	Leberassoziierte Lymphozyten
LB	Luria-Bertani Medium
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LSEC	<i>liver sinusoidal endothelial cells</i>
M	Molar
MACS	<i>magnetic cell sorting</i>
mCMV	murines Cytomegalovirus
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MEF	Murine embryofetale Fibroblasten
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
mF	Millifarad
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid

MgSO <sub>4</sub> .....	Magnesiumsulfat
MHC .....	<i>major histocompatibility complex</i>
ml.....	Milliliter
MIE .....	<i>major immediate early</i>
MIEPE .....	<i>major immediate early promoter enhancer</i>
min.....	Minute
mm .....	Millimeter
mM .....	Millimol
MOI.....	<i>multiplicity of infection</i>
MPN .....	<i>most probable number</i>
µl .....	Mikroliter
µm .....	Mikrometer
MW .....	Molekulargewicht
NaAc.....	Natriumacetat
NaCl .....	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .....	Natriumcarbonat
NaHCO <sub>3</sub> .....	Natriumhydrogencarbonat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH .....	Natriumhydroxid
ng .....	Nanogramm
NIEP.....	<i>non-infectious enveloped particle</i>
NK-Zellen .....	Natürliche Killer-Zellen
nm .....	Nanometer
nM .....	Nanomol
NO.....	Stickstoffmonoxid
OD .....	Optische Dichte
ORF.....	Offenes Leseraster ( <i>open reading frame</i> )
P.....	<i>promoter</i>
p.a. ....	<i>pro analysi</i>
PBS .....	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR.....	<i>polymerase chain reaction</i>
PE.....	Phycoerythrin
PEC.....	<i>peritoneal exudate cell</i>
PECAM.....	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PEG.....	Polyethylenglykol
PE-Cy5.....	Phycoerythrin-Cyanin 5
p.I. ....	Post Infektion
PFA .....	Paraformaldehyd
PFU .....	<i>plaque forming units</i>
pg .....	Pikogramm
pp .....	Phosphoprotein
PS.....	Phosphatidylserin
pthrp .....	<i>murine parathyroid hormone-related peptide-encoding gene</i>
qPCR.....	Quantitative <i>real-time</i> PCR
Rab.....	<i>receptor antibody</i>
rev. ....	<i>reverse</i>
Res.....	Resistenz
RPMI .....	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RRV.....	<i>Rhesus monkey rhadinovirus</i>
RT.....	Raumtemperatur (20-22°C)
RT.....	Reverse Transkriptase

---

RT-PCR.....	Reverse Transkriptase PCR
RT-qPCR.....	Quantitative <i>real-time</i> RT-PCR
SB.....	Natriumbutyrat
SCID.....	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SDS.....	Natriumdodecylsulfat
sec.....	Sekunde
SPF.....	<i>specified pathogen free</i>
SSC.....	<i>sideward scatter</i>
ssDNA.....	Einzelstrang DNA
ssRNA.....	Einzelstrang RNA
T <sub>1/2</sub> .....	Halbwertszeit
TAE.....	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i> .....	<i>Thermus aquaticus</i>
TCR.....	T-Zell Rezeptor
tdy.....	<i>male sex [testes]-determining gene Y</i>
TE.....	Tris-EDTA
T <sub>EM</sub> .....	<i>effector-memory</i> T-Zellen
TGN.....	Trans-Golgi-Netzwerk
T <sub>m</sub> .....	mittlerer Schmelzpunkt
TNF.....	Tumor Nekrose Faktor
Tris.....	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA.....	Trichostatin A
U.....	<i>units</i>
U.....	Uracil
üN.....	über Nacht
U/min.....	Umdrehungen pro Minute
UNG.....	Uracil DNA Glykosylase
UTP.....	Uridintriphosphat
UV.....	Ultraviolette Strahlung
v.....	<i>volume</i>
V.....	Volt
VBDS.....	<i>vanishing bile duct syndrome</i>
VCAM.....	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VEGF.....	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Vol.....	Volumen
VPA.....	Valproat
VSP.....	Virus Standard Puffer
VZV.....	Varicella Zoster Virus
w.....	<i>weight</i>
wt.....	Wildtyp
X-Gal.....	5-Bromo-4-chlor-3-indolyl-β-galactosid
ZZ.....	Zellzahl
ZVTE.....	Zentrale Versuchstiereinrichtung



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>I</b>
<b>Summary</b> .....	<b>II</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Klassifizierung der Herpesviren .....	1
1.2 Cytomegaloviren .....	1
1.2.1 Morphologie .....	1
1.2.2 Genomstruktur .....	2
1.2.3 Penetration der Wirtszelle .....	3
1.3 Die akute Cytomegalovirus Infektion .....	3
1.3.1 Genexpression und Replikation .....	3
1.3.2 Zell- und Organtropismus .....	4
1.3.3 Immunkontrolle .....	5
1.4 Die latente Cytomegalovirus Infektion .....	6
1.4.1 Genexpression .....	6
1.4.2 Zell- und Organtropismus .....	7
1.4.3 Immunkontrolle .....	8
1.4.4 Reaktivierung .....	9
1.5 Übertragung und klinische Aspekte der Cytomegalovirus Infektion.....	10
1.6 Pathogenese der Infektion unter Immunsuppression .....	11
1.6.1 Knochenmarktransplantation .....	11
1.6.2 Organtransplantation .....	11
1.7 Die mCMV Infektion der Maus als Modellsystem für eine hCMV Infektion .	13
1.8 Die Leber .....	13
1.9 Das hepatische Sinusoid .....	14
1.9.1 Parenchymale Zellen .....	15
1.9.2 Nichtparenchymale Zellen .....	16
1.9.2.1 Sinusoidale Endothelzellen.....	16
1.9.2.2 Kupffer Zellen.....	17
1.9.2.3 Ito Zellen (Hepatische Sternzellen).....	18
1.9.2.4 Leberassoziierte Lymphozyten .....	18
1.9.2.5 Dendritische Zellen .....	19
1.9.3 Differenzierung von LSEC, glatten Muskelzellen und Kupffer Zellen .....	19
1.10 Zielsetzung.....	21

---

<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>22</b>
2.1	Allgemeine Laborgeräte und Reagenzien.....	22
2.1.1	Allgemeine Laborgeräte.....	22
2.1.2	Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien.....	23
2.1.3	Chemikalien .....	26
2.1.4	Kits .....	28
2.1.5	Enzyme .....	28
2.1.6	Antikörper .....	29
2.1.6.1	FACS Antikörper.....	29
2.1.6.2	<i>Micro-Beads</i> gekoppelte MACS Antikörper .....	30
2.2	Virus.....	30
2.3	Versuchstiere .....	30
2.4	Tierexperimentelle Methoden .....	31
2.4.1	Immunsuppression.....	31
2.4.2	Intraplantare mCMV Infektion .....	31
2.4.3	Experimentelle Knochenmarktransplantation und Infektion.....	31
2.4.3.1	Isolierung von Knochenmarkzellen .....	32
2.4.3.2	Bestrahlung der Rezipienten, Knochenmarktransplantation und Infektion .....	32
2.4.4	Blutentnahme aus der Schwanzvene .....	32
2.4.5	Leberperfusion zur anschließenden Hepatozytenisolierung.....	33
2.4.6	Leberperfusion zur anschließenden Isolierung der gesamten nichtparenchymalen Zellen .....	34
2.4.6.1	Leberperfusion zur anschließenden Isolierung nichtparenchymaler Zellen für Elutriation.....	35
2.4.6.2	Leberperfusion zur anschließenden Isolierung nichtparenchymaler Zellen zur LSEC Gewinnung .....	36
2.4.6.3	Leberperfusion zur anschließenden Kultivierung von Leberstücken .....	36
2.4.7	LSEC Transplantation.....	36
2.4.8	Organentnahme und Probenkonservierung.....	36
2.5	Zellbiologische Methoden .....	36
2.5.1	Isolierung von Hepatozyten .....	36
2.5.2	Isolierung nichtparenchymaler Zellen via Optiprep oder Nycodenz Dichtegradienten.....	37
2.5.3	Isolierung von LSEC und Kupffer Zellen durch Elutriation.....	38
2.6	Zellkulturmaterialien.....	40
2.6.1	Medienzusätze und Reagenzien.....	40
2.6.2	Zellkulturmedien.....	41
2.7	Zell- und Gewebekulturmethoden.....	42
2.7.1	Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen.....	42
2.7.2	Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität .....	42
2.7.3	Anlage von murinen embryofetalen Fibroblasten .....	43
2.7.4	Kultivierung und Reinheitsbestimmung von LSEC .....	44
2.7.4.1	Beschichtung von Oberflächen mit Kollagen .....	44
2.7.4.2	Beschichtung von Oberflächen mit Fibronectin .....	44

---

2.7.4.3	LSEC Kultivierung.....	44
2.7.4.4	Reinheitsbestimmung von LSEC .....	44
2.7.5	Kultivierung von Gewebeexplantaten .....	45
2.8	Virologische Methoden .....	45
2.8.1	mCMV Produktion.....	45
2.8.2	mCMV Titerbestimmung .....	47
2.8.3	Zentrifugale Infektion von MEF .....	47
2.9	Molekularbiologische Methoden .....	47
2.9.1	Oligonukleotide .....	47
2.9.1.1	Oligonukleotide für Klonierungen.....	48
2.9.1.2	Oligonukleotide für SYBR-Green Quantifizierungen.....	49
2.9.1.3	Oligonukleotide für TaqMan Quantifizierungen.....	50
2.9.1.4	Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide (TaqMan Sonden) für quantitative PCR und quantitative RT-PCR .....	51
2.9.2	Bakterienstämme .....	52
2.9.3	Vektorsysteme .....	52
2.10	Molekularbiologische Standardmethoden DNA .....	52
2.10.1	Isolierung von DNA aus Zellen, Geweben und Virusstocks.....	52
2.10.1.1	Aufarbeitung der Leber zur anschließenden phenolischen DNA Extraktion .....	52
2.10.1.2	DNA Isolierung aus Organen, Zellen und Geweben.....	53
2.10.1.3	DNA Isolierung aus Blut.....	54
2.10.1.4	DNA Isolierung aus Virusstocks.....	54
2.10.1.5	Phenolische DNA Extraktion.....	54
2.10.2	Präzipitation von Nukleinsäuren .....	55
2.10.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA .....	56
2.10.4	Spaltung von Nukleinsäuren mit Restriktionsenzymen.....	56
2.10.5	Agarose Gelelektrophorese von DNA.....	57
2.10.6	Elution von DNA aus Agarosegelen.....	58
2.10.6.1	Gelelution mit QIAEX II Kit.....	58
2.10.6.2	Gelelution mit QIAquick Gel Extraction Kit.....	58
2.10.7	Reinigung von DNA .....	59
2.10.8	Dephosphorylierung linearer DNA .....	59
2.10.9	Ligation von DNA Fragmenten.....	59
2.10.10	Ligation von DNA Fragmenten mit PCR Cloning Kit.....	60
2.10.11	Bakterienanzucht .....	60
2.10.11.1	Flüssigkulturen.....	60
2.10.11.2	Plattenkulturen .....	61
2.10.11.3	Dauerkulturen .....	62
2.10.12	Transformation kompetenter Bakterien.....	62
2.10.12.1	Kompetenzinduktion mittels CaCl <sub>2</sub> .....	62
2.10.12.2	Transformation chemisch kompetenter Bakterien .....	62
2.10.12.3	Herstellung elektrokompenter Bakterien.....	63
2.10.12.4	Transformation elektrokompenter Bakterien.....	63
2.10.13	Plasmid-DNA Präparationen.....	64

2.10.13.1	Schnellpräparation von Plasmid-DNA.....	64
2.10.13.2	QIAprep Spin Miniprep.....	65
2.10.13.3	QIAGEN Plasmid-Maxipräparation .....	65
2.10.14	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	66
2.10.14.1	PCR für Klonierungszwecke .....	67
2.10.14.2	Quantitative <i>real-time</i> PCR (qPCR) .....	68
2.10.14.2.1	Plasmid-Standards zur absoluten Quantifizierung.....	69
2.10.14.2.2	LightCycler qPCR .....	69
2.10.14.2.3	TaqMan qPCR .....	71
2.11	Molekularbiologische Standardmethoden RNA .....	74
2.11.1	Vorbehandlung von Geräten und Flüssigkeiten.....	74
2.11.2	Isolierung von RNA.....	74
2.11.3	Herstellung von <i>in vitro</i> Transkripten .....	75
2.11.3.1	Einstellen der <i>in vitro</i> Transkripte für RT-qPCR.....	75
2.11.4	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR).....	76
2.11.4.1	RT-PCR für Klonierungszwecke .....	76
2.11.4.2	TaqMan RT-qPCR .....	77
2.12	Immunologische Methoden.....	78
2.12.1	MACS Separation .....	78
2.12.1.1	Separation über autoMACS .....	79
2.12.1.2	Separation über MACS Säulen.....	79
2.12.2	Zytofluorometrische Analysen.....	80
2.12.2.1	Funktionsprinzipien des Durchflusszytometers und Datenakquisition .....	80
2.12.2.2	Zellfärbungen .....	81
2.12.2.3	Quantifizierung toter Zellen in Zellkulturen .....	82
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>84</b>
3.1	Etablierung einer qPCR zur Bestimmung viraler und zellulärer DNA .....	85
3.1.1	Konstruktion der Plasmid-Standards .....	85
3.1.2	qPCRs zur absoluten Quantifizierung von <i>M55/gB</i> , <i>ie3</i> , <i>pTHR</i> und <i>tdy</i> .....	86
3.1.2.1	LightCycler DNA Quantifizierungen mit SYBR-Green .....	87
3.1.2.2	TaqMan DNA Quantifizierungen mit SYBR-Green .....	89
3.1.2.3	DNA Quantifizierungen mit TaqMan Sonden.....	93
3.1.2.4	Überprüfung des Plasmid-Standards.....	96
3.1.2.5	Einfluss niedriger Teilchenzahlen auf die qPCR.....	98
3.1.2.6	Einfluss der DNA Konzentration auf die Sensitivität der qPCR .....	99
3.1.2.7	Einfluss der DNA Konzentration auf den C <sub>T</sub> -Wert der qPCR.....	99
3.2	Kinetik viraler DNA <i>Load</i> nach KMT .....	100
3.3	mCMV Reaktivierung aus Organexplantaten.....	102
3.3.1	Latente virale DNA <i>Load</i> in der Leber.....	103
3.3.2	Reaktivierung von mCMV aus Organexplantaten.....	106
3.4	Virale DNA <i>Load</i> in Hepatozyten .....	108
3.5	Separation nichtparenchymaler Zellen mittels Gegenstromzentrifugation.....	109
3.5.1	Bestimmung der viralen DNA <i>Load</i> in Endothel und Kupffer Zellen .....	109
3.6	FACS Analysen und MACS Separation nichtparenchymaler Zellen.....	111

3.6.1	FACS Analysen nichtparenchymaler Zellen .....	111
3.6.2	MACS Separation nichtparenchymaler Zellen aus latent infizierten Lebern.....	115
3.7	Test des ME-9F1 ( $\alpha$ -LSEC) Antikörpers .....	117
3.7.1	ME-9F1 Antikörper Titration.....	117
3.7.2	MACS Separationen mit dem ME-9F1 Antikörper .....	118
3.7.3	Reinheitsbestimmung der LSEC.....	120
3.7.3.1	Reinheitsbestimmung mit acetyliertem <i>low density lipoprotein</i> .....	120
3.7.3.2	Reinheitsbestimmung ME-9F1-positiver Zellen im FACS.....	121
3.7.4	Quantifizierung viraler Genome aus isolierten ME-9F1 <sup>+</sup> Zellen .....	122
3.7.5	Isolierung von ME-9F1 <sup>high</sup> und ME-9F1 <sup>low</sup> LSEC .....	123
3.7.6	Charakterisierung der Oberflächenrezeptoren auf isolierten LSEC.....	124
3.7.7	Isolierung von ME-9F1 <sup>+</sup> /CD31 <sup>+</sup> LSEC aus ME-9F1 <sup>+</sup> Zellen.....	126
3.7.8	Isolierung von ME-9F1 <sup>+</sup> /CD31 <sup>+</sup> LSEC aus nichtparenchymalen Zellen....	127
3.7.9	Trennung von ME-9F1 <sup>+</sup> /MHC Klasse II <sup>+</sup> und ME-9F1 <sup>+</sup> /MHC Klasse II <sup>-</sup> Zellen aus isolierten LSEC.....	130
3.8	Bestimmung der Frequenz latent infizierter LSEC.....	131
3.9	Charakterisierung der Genexpression in der latent infizierten Leber und in LSEC.....	133
3.9.1	Klonierung und <i>in vitro</i> Transkription viraler Standards .....	134
3.9.2	Etablierungen von <i>Singleplex</i> und <i>Duplex</i> RT-qPCRs zum Nachweis viraler Transkripte .....	134
3.9.3	Virale Genexpression in der Leber latent infizierter Mäuse .....	137
3.9.4	Virale Genexpression in latent infizierten LSEC .....	138
3.9.5	Induktion viraler Transkripte aus LSEC durch Histondeacetylase Inhibitoren .....	140
3.10	mCMV Reaktivierung aus latent infizierten LSEC.....	143
3.10.1	mCMV Reaktivierung durch Kokultivierung latent infizierter LSEC mit MEF.....	144
3.10.2	mCMV Reaktivierung durch adoptiven Transfer latent infizierter LSEC ...	145
3.10.2.1	Adoptiver Transfer isolierter LSEC aus männlichen Mäusen in weibliche Mäuse .....	146
3.10.2.2	Adoptiver Transfer latent infizierter LSEC.....	149
3.11	Ausschluss hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen des KM als Quelle latenter viraler Genome .....	152
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>157</b>
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>171</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>195</b>
<b>7</b>	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>203</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Klassifizierung der Herpesviren

Die Familie der *Herpesviridae* umfasst derzeit 8 humanpathogene und über 100 tierpathogene Erreger (Übersicht: Roizman et al., 1992), die in die Subfamilien der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -*Herpesvirinae* unterteilt sind (Roizman et al., 1981). Diese Einteilung erfolgte anhand des Wirtsspektrums, der Replikationsgeschwindigkeit und des Zelltropismus. Die humanpathogenen Herpesviren werden wie nachfolgend beschrieben klassifiziert. Die  $\alpha$ -*Herpesvirinae* Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1 bzw. HHV-1) (Gruter, 1924), Herpes Simplex Virus-2 (HSV-2 bzw. HHV-2) (Schneweis, 1962) und Varicella Zoster Virus (VZV bzw. HHV-3) (Dumas et al., 1980) zeichnen sich durch ihr breites Wirtsspektrum sowie einen kurzen Replikationszyklus aus und persistieren primär in sensorischen Ganglienzellen des Wirts. Die  $\beta$ -*Herpesvirinae* humanes Cytomegalovirus (hCMV bzw. HHV-5) (Smith, 1956), HHV-6 (Salahuddin et al., 1986) und HHV-7 (Frenkel et al., 1990) hingegen zeigen eine strikte Speziespezifität sowie einen langsamen Replikationszyklus. Sie besitzen die Fähigkeit, unter anderem Speicheldrüsenzellen, retikuläre Zellen, Nierenzellen und Zellen anderer Gewebe zu infizieren und dort zu persistieren (Übersicht: Mocarski & Courcelle, 2001; Übersicht: Roizman & Pellet, 2001). Die  $\gamma$ -*Herpesvirinae* Epstein-Barr Virus (EBV bzw. HHV-4) (Epstein et al., 1965) und Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus (KSHV bzw. HHV-8) (Chang et al., 1994) besitzen ebenfalls eine strikte Speziespezifität und die Eigenschaft, T- und B-Lymphozyten zu infizieren und in ihnen zu persistieren (Übersicht: Roizman & Pellett, 2001).

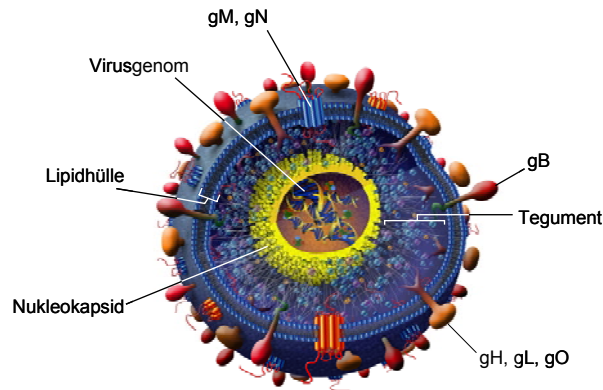
## 1.2 Cytomegaloviren

Die Cytomegaloviren sind DNA Viren und gehören zur Unterfamilie der  $\beta$ -*Herpesvirinae*. Namensgebend für diese Gruppe war die charakteristische, mit nukleären Einschlusskörpern verbundene Vergrößerung der infizierten Zellen (Zytomegalie), die zur Bezeichnung „Eulenaugenzellen“ geführt hat (Weller et al., 1960).

### 1.2.1 Morphologie

Den Cytomegaloviren wie auch allen anderen *Herpesviridae* gemein ist die charakteristische einheitliche Struktur ihrer Virionen (Abb. 1.1). Die reifen CMV Virionen weisen einen Durchmesser von 150 bis 200nm auf. Im Virion liegt die lineare, doppelsträngige DNA spindelförmig mit fibrillären Proteinen assoziiert vor und ist vom Nukleokapsid umgeben. Das ikosaedrische Nukleokapsid hat einen Durchmesser von 100nm und setzt sich aus 150 Hexameren, 12 Pentameren und 320 Triplexen (Chen et al., 1999) zusammen, welche beim humanen Cytomegalovirus (hCMV) aus 5, bzw. beim murinen Cytomegalovirus (mCMV) aus 4 viralen Proteinen aufgebaut sind. Zwischen Nukleokapsid und Hüllmembran befindet sich

das Tegument, welches aus einer amorphen Proteinmatrix von ungefähr 25 Proteinen besteht. Die das Virion umgebende Hüllmembran (*envelope*) besteht aus einer Lipiddoppelschicht zellulären Ursprungs, in die virale Glykoproteinkomplexe eingebettet sind, durch welche die Anheftung des Virus an die Wirtszelle vermittelt wird (Übersicht: Mocarski & Courcelle, 2001; Übersicht: Streblow et al., 2006).



**Abb. 1.1 Strukturmodell des hCMV Virions (verändert nach Streblow et al., 2006)**

Sowohl hCMV als auch mCMV sind dreischichtig aus Nukleokapsid, Tegument und der äußeren Lipiddoppelschicht aufgebaut. Glykoproteinkomplex I: gB; Glykoproteinkomplex II: gM, gN; Glykoproteinkomplex III: gH, gL, gO (Übersicht: Boehme & Compton, 2006).

Werden Zellen mit hCMV infiziert, bilden sie neben infektiösen Virionen auch nicht-infektiöse umhüllte Partikel (*non-infectious enveloped particles*, NIEPs) und *dense bodies* (DBs) – ebenfalls nicht-infektiöse umhüllte Partikel, die vorwiegend das Tegumentprotein pp65 enthalten (Irmieri & Gibson, 1983). In diesen Partikeln ist kein virales Genom nachzuweisen (Übersicht: Mocarski & Courcelle, 2001; Übersicht: Streblow et al., 2006). Demgegenüber generieren mCMV-infizierte Zellen keine *dense bodies*, können aber Multikapsidvirionen formen (Chong & Mims, 1981; Weiland et al., 1986), welche wiederum in hCMV-infizierten Zellen nicht nachzuweisen sind.

## 1.2.2 Genomstruktur

Mit bis zu 235kbp zählen die Genome von hCMV und mCMV zu den größten in der Familie der *Herpesviridae*. In früheren Veröffentlichungen wurden die DNA Sequenzen sowohl für das mCMV Genom (Rawlinson et al., 1996) als auch für das hCMV Genom (Chee et al., 1990a; Chee et al., 1990b) publiziert und seitdem wiederholt überarbeitet und korrigiert (Tang et al., 2006; Cha et al., 1996; Murphy et al., 2003a; Murphy et al., 2003b). Die Bedeutung der Mehrzahl der 172 offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF) bei mCMV und der 165 (Dolan et al., 2004) bis 200 (Novotny et al., 2001) ORFs bei hCMV ist allerdings noch immer unbekannt. Untersuchungen des *Towne* Stammes von hCMV ergaben, dass *in vitro* nur 45 von 162 ORFs essentiell, die restlichen dagegen nicht essentiell für die Virusreplikation sind (Dunn et al., 2003). Bei hCMV bestehen, wie bereits erwähnt, deutliche Diskrepanzen in der Anzahl der ermittelten ORFs, da diese Untersuchungen sowohl an Laborstämmen als auch an klinischen Isolaten durchgeführt

wurden (Cha et al., 1996; Davison et al., 2003; Dolan et al., 2004). Die hCMV Stämme unterscheiden sich sowohl auf genomischer Ebene als auch biologisch, wobei die Unterschiede auf die Propagation der hCMV Stämme in Zellkultur mit unterschiedlichen Zelltypen zurückzuführen sind. Durch intensive Kultivierung wurden Laborstämme aus ursprünglich klinischen Isolaten beispielsweise an Fibroblasten adaptiert und verloren so die Fähigkeit, andere Zelltypen, wie Epithelzellen oder Makrophagen, zu infizieren und dort zu replizieren (Übersicht: Digel & Sinzger, 2006; Übersicht: Shenk, 2006).

### 1.2.3 Penetration der Wirtszelle

Die produktive Infektion einer Zelle mit hCMV beginnt in einem initialen Schritt mit der Anheftung (*attachment*) der Virionen mittels viraler Glykoproteine (gB oder gM/gN) an Heparansulfat Proteoglykane (HSPG), die sich auf der Zelloberfläche befinden (Compton et al., 1993). Als zelluläre Rezeptoren, die stabile Bindungen der Virionen an die Zelloberfläche (*docking*) vermitteln, kommen verschiedene Kandidaten in Betracht. So wurde beispielsweise eine Bindung des virus-kodierten Glykoproteins gB an den epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) nachgewiesen (Wang et al., 2003). Allerdings ist dieser Nachweis aktuelleren Untersuchungen zufolge umstritten (Isaacson et al., 2007). Weitere Rezeptoren bzw. Proteine der Zelloberfläche, an welche hCMV Virionen binden können, sind Annexin II (Wright et al., 1994; Wright et al., 1995), CD13 (Giugni et al., 1996) oder auch Integrine (Feire et al., 2004). Allerdings wurde sowohl für Annexin II als auch für CD13 gezeigt, dass Zellen, die diese Proteine nicht exprimieren, trotzdem suszeptibel für hCMV sind (Pietropaolo & Compton, 1999). Nach Bildung multipler Heterodimere mit einem oder mehreren der genannten Rezeptoren kann die Lipidhülle des Virions pH-unabhängig mit der Zellmembran verschmelzen (*fusion*) und das Nukleokapsid mit Tegument wird in das Zytoplasma entlassen (Compton et al., 1992). Im Zytoplasma wird das Kapsid über Mikrotubuli zum Zellkern transportiert (Ogawa-Goto et al., 2003). Nach Bindung des Nukleokapsids an den Kernporenkomplex wird die virale DNA in das Nukleoplasma abgegeben und zirkularisiert dort zu einem histon-assoziierten Episom (Marks & Spector, 1984; Bolovan-Fritts et al., 1999).

## 1.3 Die akute Cytomegalovirus Infektion

Während der akuten (produktiven) Infektion können Cytomegaloviren im Wirt disseminieren und permissive Zellen und Gewebe infizieren. Dieses Kapitel gibt eine Übersicht über die virale Genexpression während der akuten Infektion, den Zelltropismus der Cytomegaloviren und die Kontrolle der akuten Infektion durch das Immunsystem.

### 1.3.1 Genexpression und Replikation

Die Genexpression von CMV ist kaskadenartig reguliert. Dabei können drei Phasen unterschieden werden: die *immediate early* (IE), *early* (E) und *late* (L) Phase (Übersicht:



Mocarski & Courcelle, 2001). Die IE Genexpression beginnt unmittelbar nach Infektion und erreicht – unabhängig von der *de novo* Synthese viraler Proteine – 4 bis 8 Stunden nach Infektion ihren Höhepunkt. Zwei der transkribierten IE Gene bei hCMV (Chee et al., 1990a; Übersicht: Stinski et al., 1991; Übersicht: Landolfo et al., 2003) und drei transkribierte Gene bei mCMV (Keil et al., 1987) befinden sich im *major immediate early* (MIE) Locus und werden als MIE Gene bezeichnet. In diesem Locus befindet sich der *major immediate early promoter enhancer* (MIEPE), eine regulatorische DNA Sequenz der MIE Gene. Der MIEPE reguliert die Transkription aller MIE Gene, der *ie1*, *ie2* und *ie3* Gene von mCMV und der *ie1* und *ie2* (entspricht dem *ie3* des mCMV) Gene von hCMV. Die Genprodukte von *ie3* bei mCMV und *ie2* bei hCMV übernehmen eine essentielle regulatorische Funktion für die koordinierte Expression der *e* Gene (Keil et al., 1984; Bühler et al., 1990; Messerle et al., 1992; Übersicht: Fortunato & Spector, 1999). Die Aktivierung der *e* Gene leitet für mCMV ca. 2 Stunden und für hCMV zwischen 4 und 24 Stunden nach Beginn der Infektion in die E Phase der viralen Genexpression über. E Proteine werden unter anderem für die Replikation des viralen Genoms benötigt (Roizman & Batterson, 1986). Der Beginn der DNA Replikation, ca. 16 Stunden (mCMV) bzw. 24-36 Stunden (hCMV) nach Infektion, definiert den Anfang der L Phase, in der vorwiegend Strukturproteine synthetisiert werden.

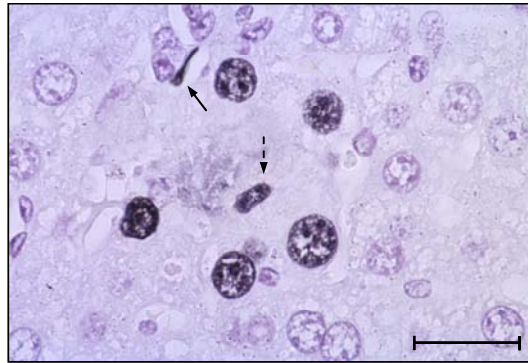
Die DNA Replikation erfolgt vom episomal vorliegenden Genom nach dem *rolling circle* Prinzip. Dabei liegen die neusynthetisierten, viralen Genome als Konkatemere vor, welche vor der Verpackung in die Nukleokapside in einzelne Genome gespalten werden (Marks & Spector, 1988). Die verpackten Genome werden durch die innere und die äußere Kernmembran transportiert. Dabei gelangen die Nukleokapside in einem als *primary envelopment* bezeichneten Vorgang durch die innere Kernmembran in den pernukleären Raum, wobei sie von der inneren Kernmembran umhüllt werden. Diese temporäre Lipidhülle fusioniert mit der äußeren Kernmembran (*de-envelopment*) und entlässt die Nukleokapside in das Zytosol. In einem als *secondary envelopment* bezeichneten Schritt werden die nackten Nukleokapside im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) mit einer doppelten Hüllmembran versehen. Von dieser fusioniert die äußere Hüllmembran mit der Plasmamembran der Zellen und setzt virale Partikel mit einer einfachen Hülle frei (Übersicht: Eickmann et al., 2006).

### 1.3.2 Zell- und Organtropismus

Eine Primärinfektion mit CMV beginnt meistens in mucosalen Epithelien als Folge eines direkten Kontaktes mit infektiösem Sekret eines infizierten Individuums. Nach der Infektion folgt eine systemische Phase der Virämie, in der infektiöses Virus via Leukozyten disseminieren und praktisch jedes Organ, bzw. Gewebe (Lunge, Pankreas, Niere, Leber Milz, Speicheldrüsen, Plazenta, Knochenmark, Herz) infizieren kann (Sinzger & Jahn, 1996; Bissinger et al., 2002). Dabei liegt infektiöses Virus im Blut nicht zellfrei vor, obwohl virale DNA im Plasma nachgewiesen werden kann (Spector et al., 1999), die allerdings stark fragmentiert ist (Boom et al., 2002). Im hämatopoetischen System sind verschiedene Zellpopulationen wie z.B. Monozyten oder Makrophagen (Mocarski & Courcelle, 2001) und dendritische Zellen (Andrews et al., 2001; Raftery et al., 2001; Dalod et al., 2003) permissiv für eine produktive CMV Infektion.

Ein Hauptzielorgan der hCMV und der mCMV Infektion stellt die Lunge dar (Baltesen et al., 1993), in welcher hCMV in Epithelzellen, mesenchymalen Zellen, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Granulozyten und Monozyten/Makrophagen (Bissinger et al., 2002) nachgewiesen werden kann. In der Leber, die ebenfalls ein Zielorgan für CMV ist, sind Gallengangszellen, Epithelzellen, Kupffer Zellen und Hepatozyten (Abb. 1.2) permissiv für CMV (Podlech et al., 1998; Bissinger et al., 2002).

Ein weiteres wichtiges Ziel einer CMV Infektion sind vaskuläre Endothelien, die eine wichtige Rolle in der viralen Replikation und Dissemination spielen. In Kapillaren und Venen verschiedener Organe wie der Lunge oder dem Gastrointestinaltrakt können infizierte Endothelzellen nachgewiesen werden (Sinzger et al., 1995). Diese Zellen können entweder durch die Ausscheidung von Viren angrenzende Zellen infizieren (Myerson et al., 1984), oder aber nach Ablösen von der Gefäßwand als so genannte *circulating cytomegalic infected cells* (CCIC) (Grefte et al., 1993b; Percivalle et al., 1993) in den Blutstrom gelangen. Da CCIC produktiv infiziert sind, kann CMV auch durch diese zirkulierenden Endothelzellen disseminieren (Grefte et al., 1993a; Grefte et al., 1994).



**Abb. 1.2 Nachweis intranukleärer IE1 Proteine nach Infektion mit mCMV-wt**

Die immunhistologische Untersuchung von IE1 (pp89, mit CROMA 101 Antikörper (Ak)) erfolgte 8 Tage nach Infektion an Lebergewebe einer durch Bestrahlung mit 7 Gray (Gy) immunsupprimierten Maus. Die großen schwarz gefärbten Zellkerne infizierter Hepatozyten sind deutlich zu erkennen. Der positive längliche Kern deutet auf eine infizierte Endothelzelle (→), der etwas gestauchte Kern auf eine infizierte Kupffer Zelle (⇨) hin. Der Balken stellt 25µm dar. Das Bild wurde freundlicherweise von Dr. J. Podlech zur Verfügung gestellt.

### 1.3.3 Immunkontrolle

Eine Primärinfektion mit CMV verläuft bei einem immunkompetenten Wirt meist inapparent, da die Infektion effektiv durch das Immunsystem kontrolliert wird. Diese Kontrolle wird durch das Zusammenspiel verschiedener Komponenten der angeborenen und der erworbenen Immunität gewährleistet (Übersicht: Krmpotic et al., 2003). Zu frühen Zeitpunkten der Infektion spielt die angeborene Immunität – hier vor allem die Natürlichen Killer (NK)-Zellen – eine wichtige Rolle in der Immunabwehr des CMV (Bukowski et al., 1984; Welsh et al., 1991; Arase et al., 2002; Übersicht: Jonjic et al., 2006). Die angeborene Immunität gegen CMV und andere virale Infektionen ist allerdings nur temporär und vermittelt im Gegensatz zur adaptiven Immunität keinen dauerhaften Schutz. Die Immunantwort durch T-Zellen setzt, bedingt durch klonale Expansion und Differenzierung der Lymphozyten, zeitverzögert etwa 3

bis 5 Tage nach Infektion ein und erreicht nach ungefähr 7 bis 10 Tagen ihr Maximum (Quinnan et al., 1978; Hokeness et al., 2007). Zusätzlich wird die humorale Immunantwort mittels CMV-spezifischer Ak, die von B-Zellen sezerniert werden, induziert. Diese spielt in der Phase der Primärinfektion – im Gegensatz zur zellulären Immunantwort – allerdings nur eine sekundäre Rolle.

Die immunologische Kontrolle zur Überwindung einer CMV Infektion wird in erster Linie von spezifischen zytotoxischen CD8 T-Lymphozyten (CTL) übernommen. Diese erkennen ein fremdes Antigen, das von einer antigenpräsentierenden Zelle als prozessiertes Peptid gebunden an ein MHC Klasse I Molekül präsentiert wird. Die spezifische Erkennung der Peptid-MHC Komplexe auf der Oberfläche infizierter Zellen erfolgt über den T-Zell Rezeptor (TCR) auf der Oberfläche der CTLs (Marrack & Kappler, 1987). Nach Antigenkontakt differenzieren naive CD8 T-Zellen zu CTLs und können infizierte Zellen erkennen und lysieren. Die vorrangige Bedeutung der adaptiven Immunantwort durch CTL für die Kontrolle der CMV Infektion konnte mehrfach bestätigt werden (Quinnan et al., 1978; Reddehase et al., 1985; Reddehase et al., 1987; Podlech et al., 1998; Podlech et al., 2000).

## 1.4 Die latente Cytomegalovirus Infektion

Die Latenz ist definiert als das Überdauern funktioneller viraler Genome in einem nicht-replikativen Zustand im Wirt nach Kontrolle der produktiven Primärinfektion. Die latenten Virusgenome können durch Stimuli jederzeit reaktivieren, was in der Rekurrenz infektiöser Viren resultiert (Roizmans & Sears, 1987).

Für lange Zeit blieb die Frage unbeantwortet, ob die Virusreplikation von CMV während der Latenz eingestellt ist (*Molekulare Latenz*) oder ob die Virusproduktion in latent infizierten Individuen unterhalb der Nachweisgrenze persistiert. Für mCMV konnte diese Frage mittlerweile geklärt werden, da mit neueren, sensitiven Methoden eine *Molekulare Latenz* sowohl in Milz und Niere (Pollock & Virgin IV, 1995), als auch in der Lunge (Kurz et al., 1997) bestätigt wurde. Die in vorangegangenen Arbeiten aufgestellte Hypothese, nach der die Detektion von IE1 Transkripten in latent infizierten Mäusen als Beweis für eine persistierende Infektion angesehen wurde (Henry & Hamilton, 1993; Yuhasz et al., 1994), erwies sich somit als falsch.

### 1.4.1 Genexpression

Die *Molekulare Latenz* des CMV impliziert nicht die vollständige Abwesenheit viraler Transkripte. In experimentellen Infektionen von Granulozyten-Makrophagen (GM)-Progenitorzellen wurden bei ausbleibender Virusproduktion verschiedene hCMV Transkripte identifiziert (Kondo et al., 1994; Kondo & Mocarski, 1995). Auf diese Weise konnten für hCMV in GM-Progenitoren 4 latenzassoziierte *sense* und 3 *antisense* Transkripte aus der *ie1/ie2* MIE Region nachgewiesen werden (Kondo et al., 1996). Es zeigte sich, dass sie allerdings nur in einem sehr geringen Anteil der GM-Progenitoren exprimiert wurden (Slobedman & Mocarski, 1999). Eines der 4 *sense* Transkripte (ORF94) kodiert für ein Kernlokalisierungssignal, ist aber sowohl für die produktive als auch für die latente Infektion nicht essentiell (White et al., 2000). Die Ergebnisse dieser und anderer Untersuchungen

basieren alle auf *in vitro* Infektionsversuchen, da geeignete *in vivo* Modelle zur Latenzuntersuchung von hCMV fehlen. Aus diesem Grund sind alle identifizierten latenzassoziierten Transkripte putativ, da zu klären bleibt, ob diese Transkripte in der hCMV Latenz *in vivo* eine Rolle spielen.

Für mCMV konnten während der Latenz ebenfalls Genprodukte des MIE Locus in der Lunge und der Milz detektiert werden. Hierbei handelt es sich um gespleißte IE1 und IE2 Transkripte der *ie1/ie3* und *ie2* Transkriptionseinheiten (Kurz et al., 1999; Kurz & Reddehase, 1999; Grzimek et al., 2001) in der Lunge und um IE1 Transkripte in der Milz (Henry & Hamilton, 1993). Das gebildete IE1 Protein ist *in vitro* nicht essentiell, es ist allerdings wesentlich für eine effiziente *in vivo* Replikation in infizierten Zellen und damit für die *in vivo* Virulenz (Ghazal et al., 2005). Die Funktion des IE2 Proteins ist bisher nicht bekannt. Für die Virusreplikation ist es weder *in vitro* noch *in vivo* essentiell und auch für die Etablierung von Latenz ist es nicht notwendig (Cardin et al., 1995). IE3 Transkripte, die durch differentielles *splicing* des primären IE1/3 Transkriptes entstehen, dienen als Transaktivatoren für die nachgeschaltete virale *e* Genexpression und sind damit essentiell für den produktiven Zyklus (Angulo et al., 2000). Allerdings konnten während der Latenz keine IE3 Transkripte nachgewiesen werden. Dementsprechend werden andere essentielle Gene der E oder der L Phase, wie beispielsweise *M55/gB*, nicht transkribiert, wodurch die Latenz trotz Aktivität des MIE Locus aufrechterhalten wird (Simon et al., 2006a; Übersicht: Simon et al., 2006b; Übersicht: Reddehase et al., 2007).

#### 1.4.2 Zell- und Organtropismus

Während der latenten hCMV Infektion ist virale DNA in multiplen Organen wie Lunge, Leber, Herz, Niere und Pankreas detektierbar (Koffron et al., 1997). Die zellulären Orte der hCMV Latenz sind allerdings bis jetzt nicht eindeutig bestimmt. Untersuchungen deuten darauf hin, dass latentes hCMV in Zellen myeloiden Ursprungs wie Granulozyten, Monozyten/Markophagen und Dendritischen Zellen (Sinclair & Sissons, 1996; Hahn et al., 1998; Söderberg-Nauclér & Nelson, 1999; Übersicht: Mocarski et al., 2006) verbleibt. Alle lymphoiden und myeloiden Zellen entstehen aus pluripotenten CD34<sup>+</sup> Progenitorzellen, die sich im Knochenmark (KM) befinden (Metcalf, 1989). In diesen CD34<sup>+</sup> Progenitorzellen kann hCMV ebenfalls detektiert werden (Minton et al., 1994; Mendelson et al., 1996); deshalb sollte latentes hCMV in allen ausdifferenzierten Zellen hämatopoetischen Ursprungs nachweisbar sein. Interessanterweise konnten aber bisher in polymorphkernigen Leukozyten, T-Zell- und B-Zell-Fraktionen keine Virusgenome nachgewiesen werden (Taylor-Wiedeman et al., 1991, Taylor-Wiedeman et al., 1993). Aus welchem Grund hCMV nur in einigen Untergruppen von Zellen, die aus CD34<sup>+</sup> Zellen hervorgegangen sind, zu finden ist, ist bisher nicht bekannt.

Eine Subpopulation der CD34<sup>+</sup> Zellen aus dem KM ist CD133<sup>+</sup> und kann zu Endothelzellen differenzieren (Goodell et al., 1996; Quirici et al., 2001). Deshalb besteht die Möglichkeit, dass die von KM-Progenitoren abstammenden Endothelzellen ebenfalls Orte der hCMV Latenz sind. Dies wird unterstützt durch die Detektion von latentem oder persistierendem hCMV in makrovaskulären Endothelzellen (Fish et al., 1998; Jarvis & Nelson, 2002). Neben den makrovaskulären Endothelzellen der Aorta wurden ebenfalls glatte Muskelzellen der

Arterien als Latenzorte identifiziert (Melnick et al., 1983). Diese Befunde werden allerdings kontrovers diskutiert, da Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe zeigten, dass in seropositiven Individuen weder in Endothelzellen noch in glatten Muskelzellen hCMV Genome nachweisbar sind (Reeves et al., 2004).

Analog zu hCMV wurde latentes mCMV ebenfalls in verschiedenen Organen wie Leber, Lunge, Milz, Herz, Niere und Speicheldrüsen nachgewiesen (Collins et al., 1993; Reddehase et al., 1994; Pollock & Virgin, 1995). Hierbei zeigte sich, dass die virale DNA Load in den Organen von verschiedenen Faktoren, wie beispielsweise dem Alter der Mäuse bei der Infektion, abhängig ist (Collins et al., 1993; Reddehase et al., 1994). Auf der zellulären Ebene wurde latentes mCMV in Makrophagen (Brautigam et al., 1979; Pollock et al., 1997; Koffron et al., 1998) und im KM (Koffron et al., 1998) detektiert, was die Annahme nahe legt, dass hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen die Orte latenter mCMV Infektion sind. Longitudinale Analysen belegten jedoch eine kontinuierliche Abnahme der Menge an viraler DNA in KM und Blut, wohingegen in den oben aufgeführten Organen eine hohe Genomlast lebenslang nachweisbar bleibt (Kurz et al., 1997; Kurz & Reddehase, 1999; Übersicht: Reddehase et al., 2002). Somit ist die *Hämatopoetische Latenz* nur als temporär zu betrachten, während in stromalen/parenchymalen Zellen eine *Permanente Latenz* ausgebildet wird. Als mögliche Kandidaten, die eine *Permanente Latenz* ausbilden können, kommen stromale, sinusoidale oder endotheliale Zellen in der Milz (Pomeroy et al., 1991; Mercer et al., 1988) und endotheliale Zellen in Leber, Milz, Niere und Herz (Koffron et al., 1998) in Frage.

### 1.4.3 Immunkontrolle

Während der latenten mCMV Infektion wird die Kontrolle der Virus Reaktivierung nicht durch die humorale Immunantwort vermittelt, wie in Versuchen mit B-Zell defizienten Mäusen ( $\mu^{-}/\mu^{-}$ ) gezeigt werden konnte. In latent infizierten  $\mu^{-}/\mu^{-}$  Mäusen wurden selektiv Lymphozytenpopulationen depletiert, wodurch eine Beteiligung von CD8 und CD4 T-Zellen sowie NK-Zellen an der Kontrolle der rekurrenten Infektion nachgewiesen werden konnte (Polić et al., 1998). Unter diesen erkennen speziell CD8 T-Zellen während der viralen Genexpression auf der Zelloberfläche durch das MHC Klasse I Molekül präsentierte virus-spezifische antigene Peptide. Bedingt durch die latenzassoziierte Genexpression von IE1 konnte eine Akkumulation IE1 epitopspezifischer CD8 T-Zellen in latent infizierten Tieren nachgewiesen werden. Die Prozessierung der entstandenen IE1 Proteine führt zur Präsentation immundominanter IE1 Peptide, die epitopspezifische CD8 T-Zellen restimulieren können. Diese aktivierten CD8 *effector-memory* T-Zellen (CD8 T<sub>EM</sub>) mit einem CD62L<sup>low</sup> Phänotyp können vornehmlich in der Lunge nachgewiesen werden (Holtappels et al., 1998; Holtappels et al., 2000; Podlech et al., 2000; Übersicht: Holtappels et al., 2006). Durch den Einsatz von Virusmutanten, bei denen die Präsentation des antigenen IE1 Peptids durch eine Punktmutation in der Ankeramino-säure, die an MHC Klasse I bindet, verhindert wurde, konnte eine Erhöhung der IE1 Transkription und eine sporadische IE3 Transkription in latent infizierten Lungenzellen beobachtet werden (Simon et al., 2006a). Da trotz der Detektion von IE1, IE3 und einer sehr geringen Zahl von gB Transkripten die Anzahl viraler Genome in den Lungen latent infizierter Mäuse, die mit der Virusmutante infiziert waren,

nicht zunahm, muss die fehlende Immunkontrolle der IE1 CD8 T<sub>EM</sub>-Zellen von anderen CD8 T-Zellen kompensiert werden (Simon et al., 2006a). Ein möglicher Kandidat hierfür sind CD8 T<sub>EM</sub>-Zellen, die spezifisch für ein weiteres immundominantes Peptid aus dem *m164* Gen sind (Holtappels et al., 2002).

#### 1.4.4 Reaktivierung

Die Frequenz der Reaktivierung von latentem CMV erhöht sich mit Abnahme der zellulären Immunität. Auch durch andere Effekte wie z.B. allogene Stimulation, zelluläre Differenzierung oder die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine kann der Prozess der Reaktivierung beeinflusst werden (Übersicht: Hummel & Abecassis, 2002). Der MIEPE stellt dabei den ersten Kontrollpunkt dar, durch den die Latenz bzw. die Reaktivierung von CMV reguliert wird (Übersicht: Meier & Stinski, 2006; Übersicht: Simon et al., 2006b; Übersicht: Reddehase et al., 2007). Ein Mechanismus zur Regulation der IE Genexpression von hCMV und folglich der Reaktivierung aus der Latenz ist die Chromatinveränderung (*chromatin remodeling*), die eine entscheidende Rolle in der Regulation des MIEPE spielt (Übersicht: Bain et al., 2006). *In vitro* Versuche ergaben, dass nicht-permissive Zellen durch die Behandlung mit dem Histondeacetylase (HDAC) Inhibitor Trichostatin A (TSA) permissiv für virale IE Genexpression wurden (Meier, 2001; Murphy et al., 2002). Des Weiteren konnte durch die Überexpression von HDAC in permissiven Zellen die virale IE Genexpression inhibiert werden (Murphy et al., 2002). Diese *in vitro* Infektionsversuche zeigten eine direkte Korrelation zwischen der unterschiedlichen Chromatinkonformation und der transkriptionellen Aktivität des MIEPE, dessen Chromatinstruktur im aktiven Zustand hyperacetyliert und hypomethyliert vorliegen muss. Im Gegensatz zu den *in vitro* Versuchen der Reaktivierung durch Chromatinveränderung für hCMV ist es bei mCMV möglich, Latenz und Reaktivierung *in vivo* im Gewebeverband unter der Kontrolle des Immunsystems zu untersuchen. Hier ergaben Transkriptanalysen aus den in eine definierte Anzahl von Stücken geteilten Lungen latent infizierter Mäuse eine variierte Expression von IE Transkripten. Auf die MIE Region bezogen wurde der Nachweis viraler Genome in der Lunge bei gleichzeitiger Abwesenheit viraler IE Transkripte als „MIE Locus Latenz“ definiert. Die Transkriptanalysen ausgewählter Markergene nicht nur für die IE Phase sondern auch für die L Phase führten zu der sogenannten *silencing/desilencing* Hypothese. Diese postuliert, dass eine offene Chromatinstruktur am MIE Locus alleine nicht ausreichend ist, sondern – zumindest temporär - alle essentiellen Loci des mCMV Genoms umfassen muss, um eine Reaktivierung zu induzieren (Übersicht: Reddehase et al., 2007). Damit konnte bewiesen werden, dass das Verständnis von CMV Latenz und Reaktivierung nicht auf den MIE Locus reduziert werden darf (Übersicht: Simon et al., 2006b).

Es existieren bislang 3 verschiedene Modelle, in welchen die CMV Reaktivierung untersucht wird (Übersicht: Hummel & Abecassis, 2002). Im ersten Modell wird die Reaktivierung durch Immunsuppression induziert (Polić et al., 1998). Die Immunsuppression kann entweder durch Ganzkörperbestrahlung (Reddehase et al., 1994; Kurz und Reddehase, 1999), zytotoxische Substanzen wie Cyclophosphamid (Mayo et al., 1977; Mayo et al., 1978) oder Depletion lymphoider Zellen mittels Ak erreicht werden (Bevan et al., 1996; Polić et al., 1998). In einem zweiten Modell kann die Reaktivierung durch zelluläre Differenzierung

ausgelöst werden. Allerdings ist die Beobachtung, dass Reaktivierung durch zelluläre Differenzierung induziert wird, für die hCMV Infektion nicht allgemein gültig; sie trifft vielmehr nur auf das Monozyten/Makrophagen-System zu, in dem Unterschiede in der Permissivität der Zellen und der Expression von IE Transkripten beobachtet wurden. Hier zeigten *in vitro* Versuche, dass Monozyten im Gegensatz zu differenzierten Makrophagen nicht permissiv für hCMV sind; allerdings kann die Permissivität von Monozyten durch Zytokin-induzierte Differenzierung zu Makrophagen stimuliert werden (Söderberg-Nauclér et al., 1997a). In seropositiven Patienten konnte die Expression von IE1 durch Differenzierung der latent infizierten Monozyten mit dem *GM-colony stimulating factor* (GM-CSF) zu Makrophagen induziert werden (Taylor-Wiedeman et al., 1994). Im dritten Modell wird Reaktivierung durch die allogene Transplantation von Organen wie Niere oder Lunge (Yagyu et al., 1994; Hummel et al., 2001) oder allogene Stimulation von peripheren Blutzellen (Söderberg-Nauclér et al., 1997b) hervorgerufen. Dieses Modell ist allerdings nicht allgemein gültig, da eine Reaktivierung auch in syngenen Transplantationen, Implantationen oder Zelltransfers beobachtet wurde (Mayo et al., 1978; Hamilton & Seaworth, 1985; Bruning et al., 1986).

## 1.5 Übertragung und klinische Aspekte der Cytomegalovirus Infektion

Die Übertragung von hCMV erfolgt meist durch direkten Körperkontakt oder über Tröpfchen- und Schmierinfektion, wobei die Eintrittsorte des Virus die Epithelien des respiratorischen Trakts, des oberen Verdauungskanals oder des Urogenitaltrakts sind. Die systemische Phase der Primärinfektion geht einher mit der Freisetzung von persistierendem Virus durch Urin, Genitalsekrete, Speichel oder Muttermilch. Normalerweise verläuft die CMV Infektion in immunkompetenten Individuen klinisch unauffällig, kann aber in einigen Fällen für eine Mononukleose, die ähnlich der EBV induzierten Erkrankung ist, verantwortlich sein (Klemola et al., 1970). Klinisch manifestiert sich diese Erkrankung u.a. in Unwohlsein, Kopfschmerzen, Fieber, Lymphozytose, erhöhten Serumtransaminasen und Müdigkeit. Diese Symptome können über mehrere Wochen bestehen (Übersicht: Pass, 2001).

Eine Primärinfektion mit hCMV während der Schwangerschaft kann zu einer transplazentalen Infektion des Embryos oder Fötus führen und äußert sich in schweren Organschäden (Boppana et al., 1992). Symptome sind unter anderem durch Thrombozytopenien ausgelöste Petechien, Ikterus, Hepatosplenomegalie und Mikrozephalie (Boppana et al., 1997). Die Symptome, die durch die Beteiligung des retikuloendothelialen Systems ausgelöst werden, klingen üblicherweise innerhalb weniger Wochen nach Geburt wieder ab. Jedoch können kongenitale hCMV Infektionen schwerwiegende Erkrankungen hervorrufen, welche in 10% der Fälle zum Tode der Neugeborenen führen (Boppana et al., 1992). Die Pathogenese der rekurrenten Infektion einer Schwangeren führt dagegen seltener zu schweren Schäden des Embryos (Hanshaw & Dudgeon, 1978; Stagno & Whitley, 1985), da die virale Dissemination durch schon vorhandene antivirale Ak vermindert wird (Stagno et al., 1982; Yow, 1989).

Epidemiologische Untersuchungen und pathologische Studien ergaben Hinweise auf eine Verbindung zwischen CMV und Arteriosklerose (Melnick et al., 1983; Adam et al., 1987; Hendrix et al., 1990), die durch Entzündungen des vaskulären Systems hervorgerufen

werden kann. In seropositiven Patienten kann latentes CMV in zirkulierenden Monozyten durch inflammatorische Zytokine oder durch Kontakt mit vaskulären Endothelzellen oder glatten Muskelzellen reaktivieren (Guetta et al., 1997). Dadurch können Änderungen im vaskulären System, wie die Proliferation glatter Muskelzellen und damit Gefäßverengungen (Lemström et al., 1993), begünstigt werden. Allerdings ist die Arteriosklerose eine Erkrankung, die durch viele Faktoren begünstigt wird, deshalb stellt die CMV Infektion nur einen möglichen Faktor in der Pathogenese dar.

## 1.6 Pathogenese der Infektion unter Immunsuppression

Cytomegaloviren sind die am häufigsten auftretenden opportunistischen Pathogene, die zu Komplikationen bei Patienten mit therapiebedingter oder krankhafter Immunsuppression führen. Dabei können CMV Erkrankungen durch Reaktivierung latenter Viren, durch Reinfektionen, aber auch durch Primärinfektionen in Patienten ausgelöst werden. Die schwersten Erkrankungen treten bei Empfängern solider Transplantate, allogenen KM-Empfängern und Patienten mit angeborener (*severe combined immunodeficiency*; SCID) oder erworbener (*acquired immunodeficiency syndrome*; AIDS) Immunabwehrschwäche auf.

### 1.6.1 Knochenmarktransplantation

Bei Empfängern nach Knochenmarktransplantationen (KMT) werden CMV Infektionen hauptsächlich durch Reaktivierung von endogenem Virus in seropositiven Patienten oder durch transplantierte latent infizierte Zellen oder Blutprodukte in seronegativen und seropositiven Patienten ausgelöst. Dabei sind Pneumonien die am weitesten verbreiteten Erkrankungen unter KMT Patienten (Boeckh & Bowden, 1995). Zusätzlich zum Serostatus von Spender und Empfänger vor Transplantation ist die allogene Reaktivität, die durch Histoinkompatibilität von Spender und Empfänger bedingt ist, ein Risikofaktor für eine CMV Erkrankung nach Transplantation. Allogene KMT Patienten erhalten deshalb zur Prophylaxe der *graft versus host* (GvH) Erkrankung, die bei signifikanter Histoinkompatibilität von Spender und Empfänger stark ausgeprägt ist, über einen längeren Zeitraum eine immunsuppressive Therapie (Zaia & Forman, 1995). Im Gegensatz dazu ist nach autologer Transplantation zwischen Zwillingen zwar die Ausscheidung von CMV weit verbreitet, allerdings kommt es selten zur CMV Erkrankung (Übersicht: Pass, 2001).

### 1.6.2 Organtransplantation

Bei Organtransplantationen lassen sich verschiedene Quellen der CMV Infektion unterscheiden. Latentes Virus kann entweder im Empfänger reaktivieren, der Empfänger kann sich mit CMV infizieren, das nicht vom Spender stammt oder CMV wird durch das transplantierte Organ oder durch Blutprodukte übertragen. Die extrinsischen Übertragungswege führen entweder zu einer Primärinfektion oder zu einer Reinfektion mit einem anderen Virusstamm. Im Allgemeinen verlaufen primäre Infektionen durch das



transplantierte Organ schwerwiegender als eine Reaktivierung oder Reinfektion, wobei die Schwere der Erkrankung vom transplantierten Organ und vom Status der Immunsuppression abhängig ist (Bissinger et al., 2004). Die primäre Infektion in Organtransplantatempfängern ist immer verbunden mit einer Dysfunktion des transplantierten Organs, wie beispielsweise einer Hepatitis nach Leber- oder einer Pneumonie nach Lungentransplantation (Übersicht: Pass, 2001).

Weitere Risikofaktoren für eine CMV Erkrankung nach Lebertransplantation sind der Einsatz von Antilymphozytenserum zur Immunsuppression oder die Retransplantation einer zweiten Leber im Falle einer Transplantatabstoßung (Wiesner et al., 1993). Allgemein erhöht der Einsatz von Immunsuppressiva wie beispielsweise anti-CD3 Ak (OKT-3) oder Tacrolimus (FK506) das Risiko einer hCMV Erkrankung (Woodle et al., 1993). Im Gegensatz dazu konnte im murinen Modell der CMV Infektion eine Linderung der mCMV Erkrankung durch FK506-vermittelte NK-Zell-Anreicherung beobachtet werden (Kageyama et al., 1997). Gesichert ist bislang lediglich die Wirkung von anti-Interleukin-2 Rezeptor Ak (anti-IL-2 Rab) in Bezug auf Reduktion der Inzidenz einer CMV Erkrankung (Oldakowska-Jedynak et al., 2003). Die Rolle dieser Medikamente zur Prävention der Transplantatabstoßung ist besonders wichtig, seitdem nachgewiesen werden konnte, dass dadurch die CMV-spezifische T-Zell-Antwort unterdrückt wird. Diese Unterdrückung führt wiederum zu einer anhaltenden Virämie, durch die eine alloreaktive zytotoxische Antwort auf das Transplantat ausgelöst werden kann (Übersicht: Gao & Zheng, 2004).

Ein großes Problem bei Lebertransplantationen ist die chronische Abstoßung des Transplantats, die langsam und meistens ohne auffällige Symptomatik verläuft. Histologische Merkmale hierfür sind das so genannte Gallengangsverlustsyndrom (*vanishing bile duct syndrome*, VBDS) oder vaskuläre Änderungen wie beispielsweise die obliterierende Arteritis (Vierling & Fennel, 1985; Übersicht: Demetris et al., 1990; Freese et al., 1991). Histopathologische Untersuchungen der abgestoßenen Lebertransplantate erbrachten den Nachweis persistierender CMV DNA ohne akute Infektion in Gallengängen, aber auch in Endothelzellen vaskulärer Strukturen und in Hepatozyten (Arnold et al., 1992; Lautenschlager et al., 1997). Während dieser Phase waren Kupffer Zellen, Leukozyten und sinusoidale Endothelzellen nur sporadisch positiv für virale DNA. Im Gegensatz zur chronischen Transplantatabstoßung konnte während der Behandlung einer akuten CMV Infektion nach Lebertransplantation weder in Endothelien noch in Gallengangszellen CMV DNA nachgewiesen werden (Lautenschlager et al., 2005). Mittlerweile belegen diverse Studien (Arnold et al., 1992; Lautenschlager et al., 1997; Evans et al., 1999), dass während einer akuten CMV Infektion und einer chronischen Transplantatabstoßung die zelluläre Lokalisierung der viralen DNA zwischen den Transplantaten stark variieren kann. Obwohl in verschiedenen Untersuchungen von einer Korrelation der CMV Infektion mit der Ausbildung von VBDS und somit einer Begünstigung der Lebertransplantatabstoßung berichtet wird, werden diese Beobachtungen kontrovers diskutiert (O'Grady et al., 1988; Paya et al., 1992).

## 1.7 Die mCMV Infektion der Maus als Modellsystem für eine hCMV Infektion

Die Cytomegaloviren sind an ihren spezifischen Wirt hochadaptiert, deshalb können Untersuchungen zur Infektion, Pathogenese und Latenz der hCMV Infektion nicht in rodenten Modellsystemen durchgeführt werden. In den vorangegangenen Kapiteln wurden sowohl während akuter als auch während latenter Infektion deutliche Analogien beispielsweise im Zell- und Organtropismus oder der viralen Genexpression zwischen hCMV und mCMV aufgezeigt, deshalb dient die mCMV Infektion als Modellsystem für Infektions- oder Latenzuntersuchungen.

In dieser Arbeit wurde ausschließlich das Modell der syngen KMT mit anschließender Virusinfektion zur Etablierung von Latenz verwendet (Reddehase et al., 1985; Mutter et al., 1988). Dazu werden die Empfänger zuerst mittels  $\gamma$ -Bestrahlung immunsupprimiert. Die Tiere erhalten anschließend KM aus syngen Spendern und werden mit mCMV infiziert. Die Gabe von KM kontrolliert durch Rekonstitution des Immunsystems der Empfänger effektiv die massive Virusproduktion, welche ansonsten in immunsupprimierten Tieren zum Tode führen würde (Jordan et al., 1977; Reddehase et al., 1985). Ungefähr 6 bis 8 Monate nach KMT ist die temporäre *Hämatopoetische Latenz* beendet und die *Permanente stromal/parenchymale Latenz* im Organismus etabliert.

## 1.8 Die Leber

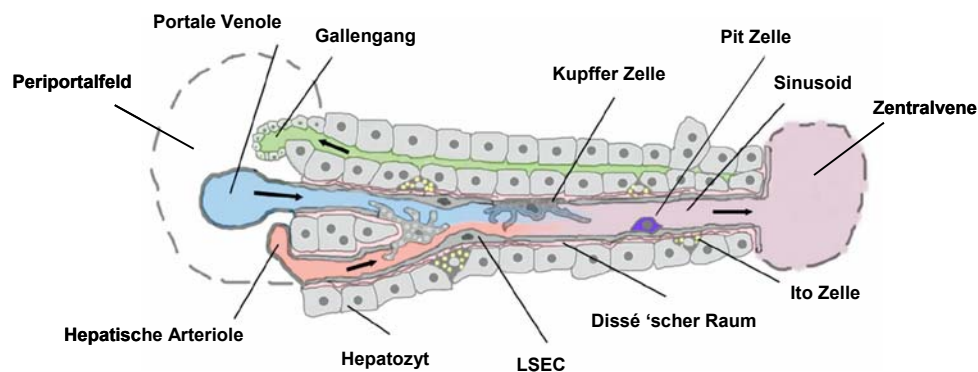
Die Leber ist das zentrale Organ des Stoffwechsels und mit 1500 bis 2000g im Menschen und 1g in der Maus die größte Drüse im Körper. Beim Menschen ist die Leber in zwei große Leberlappen (*Lobus dexter* und *Lobus sinister*), die bei der Maus jeweils noch einmal in *Lobus medialis* und *Lobus lateralis* unterteilt sind, und zwei kleine Leberlappen (*Lobus quadratus* und *Lobus caudatus*) geteilt. Alle Leberlappen sind von einer bindegewebsartigen Schicht umhüllt (Glisson Kapsel). Die Leber besitzt eine duale Blutversorgung, sie erhält zu 25% oxygeniertes Blut über die hepatische Arterie (*Arteria hepatica*) und zu 75% nährstoffreiches Blut über die Leberpfortader (*Vena portae*). Beide Gefäße treten am Leberhilus (*Porta hepatis*) in die Leber ein und verzweigen sich von dort in *Vena* und *Arteria interlobularis*, von wo aus sie letztlich die mikrovaskulären Gefäße - die hepatischen Sinusoide - erreichen. In diesen mikrovaskulären Gefäßen mischt sich das Blut, es entsteht ein arteriovenöser Blutstrom. Das Blut verlässt die Leber über die *Vena hepatica*, die in die untere Hohlvene (*Vena cava inferior*) mündet.

Als Stoffwechselorgan besitzt die Leber unterschiedliche Aufgaben. Sie ist an der Entgiftung und Metabolisierung toxischer Substanzen wie z.B. Ammoniak und an der Regulation von Kohlenhydrat-, Lipid- und Proteinstoffwechsel beteiligt. Neben den metabolischen Funktionen übernimmt die Leber auch immunologische Aufgaben. So gibt es seit längerer Zeit Hinweise dafür, dass die Leber an der Ausbildung peripherer Toleranz beteiligt ist, da allogene Lebertransplantate über MHC Barrieren hinweg gut akzeptiert werden (Cantor & Dumont, 1967; Calne et al., 1969; Kamada et al., 1981).

## 1.9 Das hepatische Sinusoid

Die hepatischen Sinusoide (Abb. 1.3) durchziehen die etwa 1,5 bis 2mm großen Leberläppchen (*Lobuli hepatis*), durch deren Mitte ein venöses Gefäß (*Vena centralis hepatis*) läuft, in das die Sinusoide münden. Jedes Leberläppchen wird von einer bindegewebsartigen Kapsel umgeben, in der nebeneinander im so genannten Periportalfeld die *Arteria interlobularis*, die *Vena interlobularis* und der Gallengang (*Ductus interlobularis bilifer*) liegen. Die hepatischen Sinusoide sind ausgekleidet durch die sinusoidalen Endothelzellen (*liver sinusoidal endothelial cells*, LSEC) der Leber (Wisse, 1970), die fenestriert sind und als diskontinuierliches Epithel die Leukozyten des Blutstroms von den Hepatozyten trennen (Wisse et al., 1985). Zwischen Endothelzellen und Hepatozyten befindet sich der Dissé'sche Raum, in dem die Ito Zellen (Sternzellen) angesiedelt sind (Ito & Nemoto, 1952). Weitere Zellen, die sich im Lumen der Sinusoide befinden, sind Kupffer Zellen (Wisse, 1974a; Wisse 1974b), Pit Zellen (hepatische NK-Zellen) (Wisse et al., 1976), Leberassoziierte Lymphozyten (LAL) (Norris et al., 1998) und Dendritische Zellen (DC) (Thomson et al., 1999).

Jedes Leberläppchen ist von mehreren Sinusoiden durchzogen, wodurch sich eine breite Auffächerung des Blutstroms und damit eine sehr niedrige Strömungsgeschwindigkeit des Blutes von 25 bis 250µm/sec ergibt (MacPhee et al., 1992). Diese niedrige Strömungsgeschwindigkeit verbunden mit dem geringen Durchmesser der Sinusoide von 7 bis 12µm bedingt einen sehr engen Kontakt der Zellen innerhalb des Sinusoids. Der Blutstrom kann sogar temporär - durch eine langsame Migration von Kupffer Zellen von ungefähr 5µm/min zusätzlich begünstigt - zum Erliegen kommen (MacPhee et al., 1992; MacPhee et al., 1995). Dieser langsame Blutfluss ist effizient für die Aufnahme von Makromolekülen durch LSEC (1.9.2.1) und sorgt für eine optimale Adhäsion zwischen den Zellen der hepatischen Sinusoide und zirkulierenden Leukozyten.

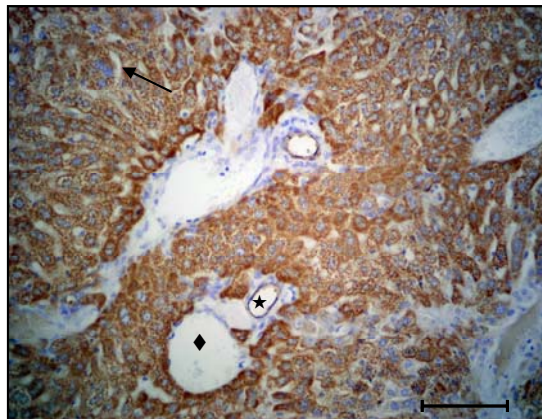


**Abb. 1.3 Architektur der Lebersinusoide (verändert nach Frevert et al., 2005)**

Im periportalen Feld teilen sich die *Arteria interlobularis* in *Hepatische Arteriolen* und die *Vena interlobularis* in *Portale Venolen* auf. Die Sinusoide münden schließlich in der *Zentralvene (Vena centralis hepatis)*. Die Pfeile geben die Flussrichtung des arteriovenösen Blutstroms (blau/rot, violett) bzw. der Gallenflüssigkeit (grün) an.

### 1.9.1 Parenchymale Zellen

Hepatozyten, die parenchymalen Zellen der Leber, haben einen Durchmesser von 20 bis 30µm und stellen mit 60 bis 80% der Gesamtzellen, bzw. 90% der Lebermasse, die größte Zellpopulation in der Leber dar (Daoust & Cantero, 1959; Blouin et al., 1977). Wie die meisten Epithelzellen sind Hepatozyten polarisiert und besitzen eine apikale (kanalikuläre) und eine basolaterale (sinusoidale) Membran (Abb. 1.3). Sie sind die funktionellen exokrinen und endokrinen Zellen der Lobuli (Abb. 1.4) und stark metabolisch aktiv. Während einer akuten systemischen Entzündung kann in Hepatozyten durch proinflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$ , Interleukin (IL)-1 und IL-6 die Bildung von Akut-Phase-Proteinen, wie z.B. C-reaktives Protein oder Komponenten der Komplementkaskade, ausgelöst werden (Übersicht: Ruminy et al., 2001). Die überwiegende Mehrheit der Hepatozyten sind entodermalen Ursprungs, aber auch Zellen aus dem KM können unter bestimmten Bedingungen zu Hepatozyten differenzieren (Lagasse et al., 2000; Theise et al., 2000a; Theise et al., 2000b). Hepatozyten exprimieren unter anderem MHC Klasse I Moleküle (Chen et al., 2005) und den Oberflächenrezeptor CD1d (Agrati et al., 2005), einen Liganden, der von NKT-Lymphozyten erkannt wird (Yu & Porcelli, 2005). Somit sind Hepatozyten zur Interaktion mit und zur Aktivierung von Lymphozyten befähigt, was durch *in vitro* Versuche, in denen Hepatozyten als antigenpräsentierende Zellen fungieren, bestätigt werden konnte (Bertolino et al., 1998; Bertolino et al., 1999). Diese Interaktionen von Hepatozyten mit zirkulierenden T-Zellen (Bertolino et al., 2001; Bowen et al., 2004) können *in vivo* durch zytoplasmatische Fortsätze - so genannte Mikrovilli - der Hepatozyten bewerkstelligt werden, die sich durch die Fenestrierungen der LSEC (1.9.2.1) in das sinusoidale Lumen erstrecken (Warren et al., 2006).



**Abb. 1.4 Verteilung von Hepatozyten, Sinusoiden und makrovaskulären Gefäßen**

Paraffinschnitt der Leber mit immunhistochemischer Färbung der Hepatozyten. Das Zytoplasma positiver Zellen ist bräunlich gefärbt. Deutlich zu erkennen sind makrovaskuläre Gefäße verschiedener Venen (◆) und Arterien (★) und die mikrovaskulären Gefäße der Lebersinusoidale (→). Der Balken stellt 100µm dar. Das Bild wurde freundlicherweise von Dr. J. Podlech zur Verfügung gestellt.

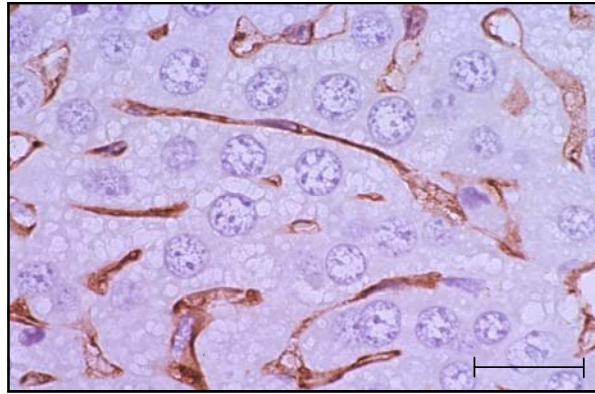
## 1.9.2 Nichtparenchymale Zellen

Während die Hepatozyten mit 60 bis 80% der Gesamtzellen die größte Population innerhalb der Leber darstellen, teilen sich die verbleibenden 20 bis 40% der nichtparenchymalen Leberzellen bzw. der Zellen der Sinusoide in 50% LSEC, 20% Kupffer Zellen, 25% Lymphozyten (davon ungefähr 63% T- Zellen, 31% NK-Zellen und 6% B-Zellen), 5% Gallengangszellen und <1% Ito-Zellen (Übersicht: Racanelli & Rehermann, 2006) auf.

### 1.9.2.1 Sinusoidale Endothelzellen

Die LSEC stellen mit 50% den größten Anteil der nichtparenchymalen Zellen dar (Abb. 1.5). Obwohl sie nur 2,8% des gesamten Lebervolumens betragen, repräsentieren sie ungefähr 15% der gesamten Zelloberfläche innerhalb der Leber (Blouin et al., 1977; Übersicht: Knolle & Limmer, 2003b). Im Gegensatz zu anderen Endothelien verfügt das sinusoidale Leberendothel über keine Basalmembran und ist von 80 bis 120nm großen Poren (Übersicht: Braet & Wisse, 2002), den sogenannten *fenestrae* (Wisse et al., 1985), durchbrochen. Deren Anzahl und Durchmesser kann durch Hormone, Medikamente, Toxine und Erkrankungen dynamisch reguliert und variiert werden (Übersicht: Braet & Wisse, 2002). Die Fenestrierungen nehmen ungefähr 6 bis 8% der gesamten endothelialen Oberfläche ein (Wisse et al., 1985) und ermöglichen den Austausch von gelösten Stoffen und kleinen Partikeln zwischen dem sinusoidalen Lumen und dem Dissé'schen Raum (Übersicht: Braet & Wisse, 2002). Außerdem vermitteln sie einen direkten Zellkontakt zwischen zytotoxischen T-Zellen des Blutstroms und den Hepatozyten (Warren et al., 2006).

Die langsame Strömungsgeschwindigkeit des Blutes in den Sinusoiden (1.9), zusammen mit der Expression multipler Oberflächenmoleküle wie Scavenger- oder Mannose-Rezeptoren auf den LSEC, bedingt eine optimale Aufnahme von Makromolekülen oder Antigenen durch die Endothelzellen aus dem sinusoidalen Blutstrom (Übersicht: Smedsrød et al., 1990; Übersicht: Knolle & Limmer, 2003b). Nach der Aufnahme können die Makromoleküle mittels Transzytose durch die LSEC in den Dissé'schen Raum entlassen werden und stehen so den Hepatozyten zur Verfügung (Kempka & Kolb-Bachofen, 1988). LSEC exprimieren verschiedene Zelladhäsionsmoleküle, davon CD54 (Scoazec & Feldmann, 1991) und CD31 (Übersicht: Knolle & Limmer, 2003a; Katz et al., 2004) konstitutiv und CD106 induzierbar (Volpes et al., 1992). Die immunologische Funktion der LSEC als antigenpräsentierende Zellen (APC), die in der Lage sind, durch Präsentation prozessierter Peptide T-Zellen zu stimulieren, wird allerdings unterschiedlich diskutiert. Einige Gruppen konnten zeigen, dass LSEC konstitutiv MHC Klasse II (Rubinstein et al., 1986), CD11c (Knolle et al., 1999), CD4 (Scoazec & Feldmann, 1990; Knolle et al., 1999) und kostimulatorische Moleküle wie CD80, CD86 und CD40 (Lohse et al., 1996; Knolle et al., 1999) exprimieren. Andere Befunde zeigten das Gegenteil. Dort waren LSEC negativ für MHC Klasse II, CD11c, CD4, CD80, CD86 und CD40 (Katz et al., 2004).



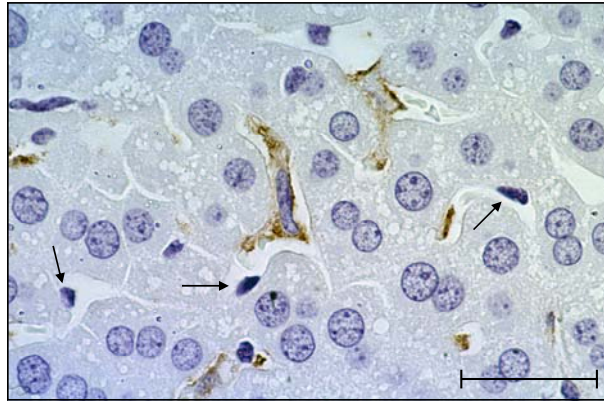
**Abb. 1.5 Immunhistochemische Färbung der LSEC in den Lebersinusoiden**

Ein Paraffinschnitt der Leber wurde mit LYVE-1 inkubiert, ein Ak, der spezifisch für lymphatische Gefäße und LSEC ist (Carreira et al., 2001). Die braun gefärbten LSEC in den Sinusoiden sind deutlich zu erkennen. Der Balken stellt 25µm dar. Das Bild wurde freundlicherweise von Dr. J. Podlech zur Verfügung gestellt.

### 1.9.2.2 Kupfer Zellen

Kupfer Zellen sind die gewebsständigen Makrophagen in der Leber (Abb. 1.6) und repräsentieren ungefähr 80 bis 90% aller Gewebsmakrophagen im Körper (Übersicht: Van de Water et al., 2003). Sie werden von zirkulierenden Monozyten gebildet, die von KM-Vorläuferzellen abstammen (Gale et al., 1978). Kupfer Zellen exprimieren eine Vielzahl immunologisch relevanter Oberflächenrezeptoren wie MHC Klasse I und II, CD80, CD86, CD106 und CD54 (Übersicht: Van de Water et al., 2003). Innerhalb der Leber sind die Kupfer Zellen vorwiegend im periportalen Feld lokalisiert, können aber aktiv innerhalb des Sinusoids wandern (1.9) (MacPhee et al., 1992) und so effizient bakterielle Endotoxine (z.B. Lipopolysaccharide, LPS), apoptotische Zellen, Immunkomplexe, Tumorzellen und Mikroorganismen aus dem Blut phagozytieren (Gregory et al., 1991; Falasca et al., 1996; Übersicht: Dini et al., 2002). Die Kupfer Zellen können abhängig von ihrer Größe in Klassen unterteilt werden, wobei die verschiedenen Klassen funktionelle Unterschiede beispielsweise in der Phagozytoseaktivität zeigen und an unterschiedlichen Stellen in den Leberlobuli lokalisiert sein können (Hardonk et al., 1989).

Nach Aufnahme von Endotoxinen wie LPS werden Kupfer Zellen aktiviert und sezernieren große Mengen proinflammatorischer Zytokine und antibakterieller Substanzen wie NO, IL-1, IL-6, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , TNF- $\alpha$  und TNF- $\beta$  (Übersicht: Decker, 1990; Wisse et al., 1996). Eine Aktivierung kann ebenfalls durch Zytokine wie IFN- $\gamma$  induziert werden, deren Rezeptoren auf den Kupfer Zellen exprimiert werden (Übersicht: Ramadori & Armbrust, 2001).



**Abb. 1.6 Immunhistochemische Färbung der Kupfer Zellen in den Lebersinusoiden**

Ein Paraffinschnitt der Leber wurde mit makrophagenspezifischem F4/80 Ak inkubiert, der selektiv an Antigene auf Makrophagen bindet. Die in den Sinusoiden befindlichen Kupfer Zellen sind deutlich an ihrer bräunlichen Färbung zu erkennen. Innerhalb der Sinusoide befinden sich noch weitere Kerne endothelialer Zellen (→). Der Balken stellt 25µm dar. Das Bild wurde freundlicherweise von Dr. J. Podlech zur Verfügung gestellt.

### 1.9.2.3 Ito Zellen (Hepatische Sternzellen)

Die Ito Zellen, auch Hepatische Sternzellen (*hepatic stellate cell*, HSC), Lipozyten oder Vitamin A Speicherzellen genannt, befinden sich zwischen den Parenchymzellen und den LSEC im Dissé'schen Raum. Ihnen werden vier wichtige Aufgaben zugeschrieben: die Bildung extrazellulärer Matrixproteine, die Retinoidspeicherung, die Produktion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen und die Verengung oder Erweiterung des sinusoidalen Lumens als Antwort auf Endothelin, Angiotensin oder Prostaglandine (Übersicht: Burt, 1999; Übersicht: Sato et al., 2003). Ito Zellen können entweder in einem ruhenden oder in einem aktivierten (transdifferenzierten) Stadium vorliegen (Friedman, 2000; Friedman & Arthur, 2002). Charakteristisch für ruhende Zellen sind zytoplasmatische Lipidtröpfchen, die in aktivierten Ito Zellen fehlen (Friedman et al., 1993). Aktivierte Ito Zellen bilden zusätzlich einen myofibroblastenähnlichen Phänotyp aus (Bachem et al., 1992). Analog zu Hepatozyten können ruhende und aktivierte Ito Zellen aus Zellen des KM abstammen, wie durch KMT-Versuche bewiesen wurde (Baba et al., 2004).

### 1.9.2.4 Leberassoziierte Lymphozyten

Die Leberassoziierten Lymphozyten (LAL) werden in konventionelle T-Zellen ( $\alpha\beta$ T-Zellen: CD4 und CD8), unkonventionelle T-Zellen (NKT-Zellen und  $\gamma\delta$ T-Zellen), NK-Zellen (Pit Zellen) und B-Zellen (Übersicht: Racanelli & Rehermann, 2006) eingeteilt. Im Gegensatz zu anderen Lymphozytenpopulationen im Blut oder in lymphoiden Organen wie der Milz oder den Lymphknoten unterscheiden sich die LAL sehr deutlich in ihrer prozentualen Zusammensetzung. In der Leber ist das Verhältnis von CD4 zu CD8  $\alpha\beta$ T-Zellen mit einem höheren Anteil an CD8 T-Zellen reziprok zum Verhältnis in anderen lymphoiden Organen (Übersicht: Winnock et al., 1995). Die Frequenz der NK-Zellen innerhalb der LAL ist mit 25% ebenfalls höher als in anderen lymphoiden Organen oder im peripheren Blut, wo nur etwa 13% NK-Zellen detektierbar sind (Norris et al., 1998; Übersicht: Crispe, 2003).

NK-Zellen sind im Lumen der Sinusoide lokalisiert und adherieren dort an Kupffer Zellen und Endothelzellen (Kaneda & Wake, 1983). Im Gegensatz zu T- und B-Zellen können sie Pseudopodien ausbilden und entlang der endothelialen Oberfläche migrieren (Kishiye et al., 1993; Übersicht: Wilttrout, 2000). NK-Zellen können Tumorzellen lysieren (Übersicht: Nakatani et al., 2004) und wirken als Bestandteil des angeborenen Immunsystems gegen Viren, intrazelluläre Bakterien und Parasiten (Trinchieri, 1989; Bancroft, 1993). Ein Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität stellen die NKT-Zellen dar, die sowohl phänotypische Merkmale klassischer NK-Zellen als auch konventioneller T-Zellen besitzen (MacDonald, 1995). Charakteristischerweise haben NKT-Zellen eine niedrigere Expression des  $\alpha\beta$ T-Zellrezeptors als zirkulierende T-Zellen (Watanabe et al., 1995). Wie die NKT-Zellen gehören auch die  $\gamma\delta$ T-Zellen zu den unkonventionellen T-Zellen, die in der Leber in ungewöhnlich hoher Konzentration (zwischen 7% und 34% aller CD3<sup>+</sup> Lymphozyten) vorhanden sind (Norris et al., 1998). In der T-Zellrezeptor-intermediären Zellpopulation wurde neben den NKT-Zellen noch eine andere Zellpopulation detektiert. Es handelt sich dabei um eine Population konventioneller CD8 T-Zellen, die apoptotisch sind und in der Leber akkumulieren (Huang et al., 1994). Im Gegensatz dazu besitzen CD4 T-Zellen kein spezielles Organ, in dem sie nach Akkumulation beseitigt werden (Übersicht: Crispe et al., 2000).

#### **1.9.2.5 Dendritische Zellen**

Die DC der Leber sind überwiegend in der periportalen Region der Leber angesiedelt (Prickett et al., 1988). In der gesunden Leber sind DC vorwiegend unreife Zellen, die Antigene aufnehmen und prozessieren können (Lau & Thomson, 2003). Nach Aktivierung können sie durch den Dissé'schen Raum in die lymphatischen Gefäße migrieren und die prozessierten Antigene in den drainierenden hepatischen Lymphknoten präsentieren (Matsuno et al., 1996; Kudo et al., 1997). Der Reifungsprozess der DC beinhaltet morphologische und phänotypische Änderungen. Die Zellen verlieren ihre Endozytose- und Phagozytose-Aktivität und exprimieren verstärkt kostimulatorische Moleküle wie CD40, CD80 und CD86 (Übersicht: van de Water et al., 2003).

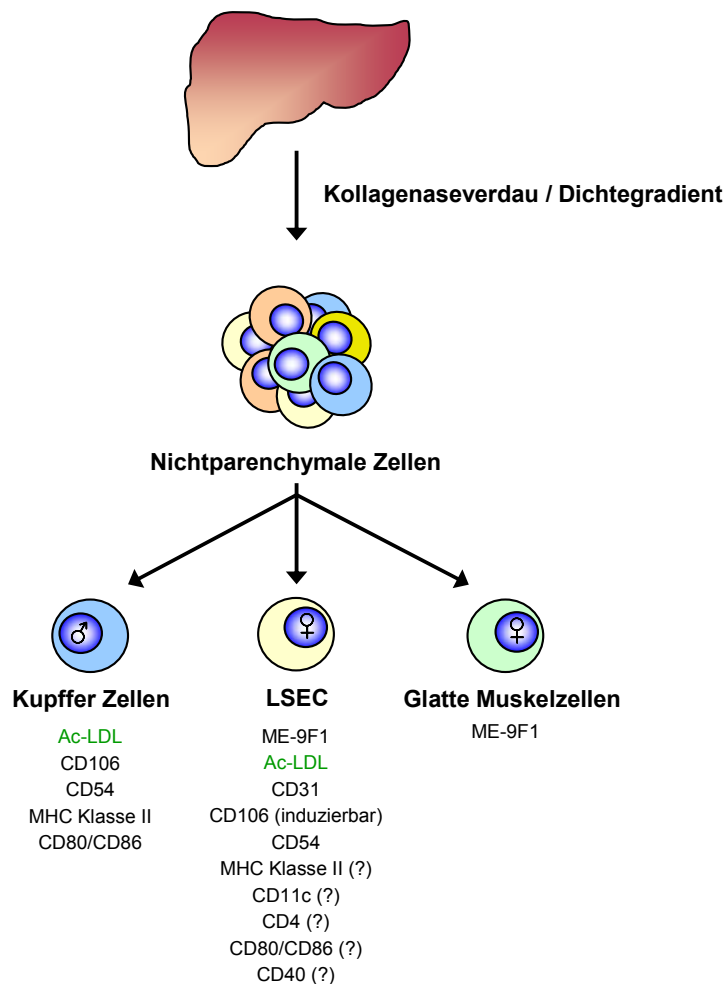
#### **1.9.3 Differenzierung von LSEC, glatten Muskelzellen und Kupffer Zellen**

Zur Differenzierung isolierter Zellfraktionen aus der Leber können drei unterschiedliche Markergruppen verwendet werden. Die Zellen können entweder aufgrund der Expression verschiedener Oberflächenantigene, auf genomischer Ebene oder durch intrazelluläre Marker unterschieden werden. Die Analysen der Oberflächenantigene und der intrazellulären Marker erfolgen mittels FACS Messungen, die Quantifizierungen auf genomischer Ebene mittels quantitativer PCR der zellulären DNA. Um allerdings eine Unterscheidung der isolierten Leberzellen auf genomischer Ebene treffen zu können, muss zuvor eine getrenntgeschlechtliche KMT (2.4.3 und 3.2) mit männlichen Knochenmark-Spendern und weiblichen Knochenmark-Empfängern durchgeführt werden, um die vom Spender abstammenden Zellen mit männlichem Genotyp (beispielsweise Kupffer Zellen) von den



Zellen der Empfänger, die einen weiblichen Genotyp besitzen (beispielsweise LSEC), unterscheiden zu können.

Die in dieser Arbeit im Ergebnisteil ausführlich beschriebene Anreicherung von LSEC wurde hauptsächlich mittels MACS Aufreinigung (2.12.1) und dem LSEC-spezifischen MACS-Antikörper ME-9F1 (2.1.6. und 3.7) durchgeführt. Allerdings ist der ME-9F1 Antikörper nicht nur für LSEC, sondern auch für glatte Muskelzellen spezifisch (Harder et al., 1991). Wie in Abb. 1.7 zu erkennen, können die ME-9F1-positiven LSEC von glatten Muskelzellen, die ebenfalls ME-9F1-positiv sind, durch den intrazellulären Marker Ac-LDL (2.7.4 und 3.7.3) oder durch die in der Abbildung aufgeführten Oberflächenantigene differenziert werden. Um Kontaminationen der isolierten LSEC Fraktion mit anderen unspezifisch isolierten Zellen - beispielsweise Kupffer Zellen - auszuschließen, können sowohl endothelzellspezifische Oberflächenantigene wie beispielsweise CD31 getestet, als auch der Anteil von Zellen mit männlichem Genotyp im MACS Eluat bestimmt werden.



**Abb. 1.7 Differenzierung von LSEC, glatten Muskelzellen und Kupffer Zellen**

Mittels Kollagenaseverdau und anschließender Dichtegradientenzentrifugation (2.4.6 und 2.5.2) werden aus der Leber nichtparenchymale Zellen isoliert. Aus der Gesamtheit der nichtparenchymalen Zellen können LSEC, glatte Muskelzellen und Kupffer Zellen durch drei unterschiedliche zelluläre Markergruppen differenziert werden. Für jede der drei Zellpopulationen sind die intrazellulären Marker (grün), die genomischen Marker (♂, ♀) und die Oberflächenantigene (schwarz) aufgeführt, wobei die mit einem „?“ versehenen Antigene in der Literatur strittig diskutiert werden (1.9.2.1).

## 1.10 Zielsetzung

Die Leber ist ein zentrales Organ der CMV Pathogenese und verantwortlich für eine signifikante Morbidität und Mortalität in immunsupprimierten Patienten wie es beispielsweise Empfänger von Lebertransplantationen darstellen. Die schwersten CMV-bedingten Krankheitsverläufe entstehen aus einer Primärinfektion des Empfängers durch die Transplantation eines soliden Organs aus seropositiven Spendern. Eine Quelle der CMV Infektion stellen hierbei die latent infizierten Zellen des transplantierten Organs dar.

Im murinen Modellsystem der latenten mCMV Infektion existieren bislang nur wenige Untersuchungen mit Fokus auf die Leber. Shanley und Kollegen (1979) untersuchten die Reaktivierung von latentem mCMV nach Immunsuppression aus der gesamten Leber, nicht aber aus einzelnen zellulären Kompartimenten. Andere Gruppen beschränkten sich auf den Nachweis viraler DNA in histologischen Untersuchungen (Koffron et al., 1998). Hier gelang der Nachweis latenter viraler DNA in Endothelzellen der Leber. Es konnten bislang allerdings keine viralen Transkripte in der latent infizierten Leber detektiert werden (Bevan et al., 1996; Koffron et al., 1998).

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung latent infizierter Zellen in der murinen Leber. Dazu sollte zunächst sichergestellt werden, dass die in isolierten Lebern vorhandenen latenten viralen Genome wieder reaktivieren und eine produktive Infektion ausbilden können. Um anschließend die zellulären Orte der mCMV Latenz genauer zu untersuchen, sollte die Leber in die einzelnen Zellpopulationen aufgetrennt und mit der höchst sensitiven Methode der quantitativen *real-time* PCR auf Präsenz viraler Genome untersucht werden. Im Anschluss an die Separationen sollten genotypische und phänotypische Charakterisierungen der positiven Zellpopulation erfolgen. Nach der Charakterisierung sollte die Frequenz latent infizierter Zellen und die Anzahl latenter viraler Genome pro Zelle durch quantitative *real-time* PCR ermittelt werden. Ebenfalls sollten mittels quantitativer *real-time* RT-PCR sowohl die gesamte Leber als auch die isolierten latent infizierten Zellen auf virale Genexpression untersucht werden. Die Verifizierung des zellulären Latenzortes sollte abschließend durch die Reaktivierung von mCMV aus den isolierten latent infizierten Zellen erbracht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Allgemeine Laborgeräte und Reagenzien

#### 2.1.1 Allgemeine Laborgeräte

autoMACS	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Brutschrank Bakterien	B6 (Heraeus, Hanau)
Brutschrank Zellen	B12, B5060 (Heraeus, Hanau)
CO <sub>2</sub> -Inkubation	(Heraeus, Hanau)
Durchflusszytometer	FACSort (Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg)
	FACSVantage SE (Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg)
Elektroporator	Gene Pulser™ (BioRad, München)
Elutriator	JE-6B (Beckman, Palo Alto)
Fluoreszenzmikroskop	Axiophot (Zeiss, Jena)
Flüssigstickstofftank	(Messer, Griesheim)
Gel-Dokumentationsanlage	Digit Store (INTAS, Göttingen)
Heizplatte/Magnetrührer	IKA Combimag RET (Janke & Kunkel, Staufen)
Invertfluoreszenzmikroskop	Leica DM IRB SL (Leica, Wetzlar)
Invertmikroskop	Leica DM (Leica, Wetzlar)
MACS <i>MultiStand</i>	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Mikrowelle	(Privileg, Fürth)
Peristaltikpumpe	Reglo Digital (Ismatec, Wertheim-Mondfel)
Photometer	BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg)
	Ultrospec III (Pharmacia, Erlangen)
	Nanodrop (PEQLAB, Erlangen)
Pipetten	(Gilson, Villies Le Bel, Frankreich)
	(Eppendorf, Hamburg)
	Rainin, Mettler Toledo (Oakland, CA, USA)
Pipettiergerät	Pipetboy (INTEGRA Biosciences, Fernwald)
<i>Power Supply</i>	EPS 301, EPS 600 (Pharmacia, Erlangen)
Präparative Zentrifuge	Sorvall RC5C Plus, (Langenselbold)
<i>Real-time</i> Geräte	ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA)
	ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA)
	LightCycler (Roche Applied Science, Mannheim)
Rotations-Vakuum Konzentrator	Christ Alpha RVC (B.Braun Biotech International, Melsungen)
Schüttelinkubator	Cellstar (NUNC, Wiesbaden)
	Certomat (Labotec, Wiesbaden)
Schüttelwasserbad	OLS 200 (Grant, VWR, Wien)

Schwingmühle MM 300	QIAGEN, Hilden; (Retsch GmbH & Co. KG, Haan)
Sicherheitswerkbank	HERA safe HS 12/2 und HS 15/2 (Heraeus, Hanau)
Tischzentrifugen	Template Tamer Oncor Appligene (Heidelberg)
	Template Tamer Captair bio (Erlab, Köln)
	centrifuge 5417 (Eppendorf, Hamburg)
	centrifuge 5417C (Eppendorf, Hamburg)
	centrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg)
	Labofuge 200 (Heraeus, Hanau)
	Labofuge 400 (Heraeus, Hanau)
	Megafuge 2.0 (Heraeus, Hanau)
	Mikrozentrifuge AL (Roth, Karlsruhe)
	Mikrozentrifuge C-1200 (National Labnet, Woodbridge, NY, USA)
<i>Thermocycler</i>	Multifuge 3 S-R (Heraeus, Hanau)
	Trio-Thermoblock (Biometra, Göttingen)
	GenAmp PCR System 9700 (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA)
Thermoschüttler	Eppendorf, Hamburg
UV-Transilluminator	FluoLink (Bachofer, Reutlingen)
	Vetter GmbH, Wiesbaden
Ultrazentrifuge	Sorvall Combi Plus, Langenselbold
Vollschutz-Kleintierbestrahlungsanlage	Typ OB 58-BA (Buchler, Braunschweig)
Waagen	BP 61 (Sartorius, Göttingen)
	Kern 510, Albstadt
Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Zählmikroskop Zellen	Nikon SE (Nikon, Düsseldorf)
Zentrifugenadapter LightCycler	Roche (Mannheim)

### 2.1.2 Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien

Einfrierröhrchen	1,8ml <i>CryoTube</i> (Nunc International, Dänemark; Nr. 375418)
Einmal-Plastikpipetten	5ml (Costar, Corning, NY; Nr. 4487)
	10ml (Costar, Corning, NY; Nr. 4488)
	25ml (Costar, Corning, NY; Nr. 4489)
	1ml (Braun, Melsungen; Nr. 9166017V)
Einmal-Spritzen	2ml (Braun, Melsungen; Nr. 4606027V)
	5ml (HSW, Tuttlingen)
	10ml (HSW, Tuttlingen)
	20ml (HSW, Tuttlingen)
Elektroporationsküvetten	<i>Gene Pulser</i> Küvetten 0,2cm Spaltbreite (BioRad, München; Nr. 165-2086)

---

	Elektroporationsküvetten 0,2cm Spaltbreite (PeqLab, Erlangen; Nr. 71-2020-LE)
FACS Röhren	12x75mm Rundboden RIA tube (Falcon, Heidelberg; Nr. 2008)
Filterspitzen	Rainin 10µl (Mettler Toledo, Oakland; Nr. GP-L10F) Rainin 200µl (Mettler Toledo, Oakland; Nr. GP-L200F) Rainin 1000µl (Mettler Toledo, Oakland; Nr. GP-L1000F) 20µl (Sarstedt, Nümbrecht; Nr. 70.760.213) 200µl (Sarstedt, Nümbrecht; Nr. 70.760.211) 1000µl (Sarstedt, Nümbrecht; Nr. 70.762.211)
Kanülen	0,4x12mm (Braun, Melsungen) 0,45x12mm (Braun, Melsungen) 0,6x30mm (Braun, Melsungen)
LightCycler Kapillaren	20µl (Roche, Mannheim; Nr. 11 909 339 001)
Mahlkugeln für MM 300, (3mm, 4mm) rostfreier Stahl	Wälzlager Vertrieb Wiesbaden GmbH, Mainz-Kastel
MACS Säulen und Zubehör	MS <i>Columns</i> (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach; Nr. 130-042-201) LS <i>Columns</i> (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach; Nr. 130-042-401) <i>Pre-Separation Filters</i> (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach; Nr. 130-041-407)
Mikrotiterplatten	96- <i>well</i> Flachbodenplatten (Greiner Bio-One, Nürtingen; Nr. 655180) 96- <i>well</i> Rundbodenplatten (Greiner Bio-One, Nürtingen; Nr. 650180)
Probenröhrchen steril	0,5ml (Biozym, Hessisch Oldendorf; Nr. 710051) 1,5ml (Biozym, Hessisch Oldendorf; Nr. 710052) 2ml (Biozym, Hessisch Oldendorf; Nr. 710053)
Reaktionsgefäße	1,5ml (Sarstedt, Nümbrecht; Nr. 72.690) 1,5ml ohne Deckel (Brandt; Nr. 780505) 2ml <i>Safe Seal</i> (Sarstedt, Nümbrecht; Nr. 72.695)
Reaktionsgefäße (PCR)	0,5ml <i>Safe Lock</i> (Eppendorf, Hamburg; Nr. 35325) 0,2ml MicroAmp <sup>R</sup> mit Deckel (Applied Biosystems, Foster, CA, USA; Nr. N801-0840) 0,2ml MicroAmp <sup>R</sup> Optical Tubes ohne Deckel (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA; N801-0933) und Optical Caps (8Caps/strip) MicroAmp <sup>R</sup> (Applied Biosystems, Foster, CA, USA; Nr. N801-0935)

---

	PCR Streifen 1x8 Gefäße 0,2ml (Greiner Bio-One, Nürtingen; Nr. 673210)
	Strip Cap für 8 Gefäße, Flachdeckel (Greiner Bio-One, Nürtingen; Nr. 373250)
Reaktionsplatten (PCR)	96-well MicroAmp <sup>R</sup> <i>Optical</i> (Applied Biosystems, Foster, CA, USA; Nr. N801-0560)
Skalpelle	Einmalskalpelle, Aesculap AG, Tuttlingen
Sterilfilter	Spritzenvorsatzfilter 0,2µm (VWR, Darmstadt; Nr. 514-0061)
	Spritzenvorsatzfilter 0,45µm (Qualilab, Merck, Bruchsal; Nr. 5122111)
	150ml Easy Flow <sup>TM</sup> Filter 0,22µm (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 357107)
	250ml Stericup Express Plus 0,22µm (Millipore, Schwalbach)
Venenverweilkanüle	Vasofix-Braunüle 22G blau, 0,9x25mm (Braun Melsungen)
Zellkulturplatten	6-well Flachbodenplatten (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353046)
	24-well Flachbodenplatten (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353047)
	48-well Flachbodenplatten (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353078)
Zellkulturschalen	60/15mm (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353004)
	100/20mm (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353003)
	150/25mm (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353025)
Zellnylonsieb	40µm (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 352340)
	100µm (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 352360)
Zentrifugenröhrchen	15ml Spitzboden Polypropylen (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 352096)
	50ml Spitzboden Polypropylen (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353070)
	15ml Spitzboden Polystyrol (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 352095)
	50ml Spitzboden Polystyrol (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 352073)
	5ml Rundboden (Greiner Bio-One, Nürtingen; Nr. 115261)

### 2.1.3 Chemikalien

Alle aufgelisteten Chemikalien und Reagenzien wurden, wenn nicht anders vermerkt, in p.a. Qualität bezogen. Zur Herstellung von Puffern und Lösungen wurden in erster Linie VE-Wasser ( $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ , Millipore, Molsheim, Frankreich) oder Aqua B. Braun Wasser (Spüllösung), bei bestimmten Ansätzen allerdings auch *Aqua bidest* (*Aqua ad iniectabilia*, Braun Melsungen) verwendet.

Agarose (SeaKem LE)	BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME, USA (Biozym: 840.004)
Agarose Multi Purpose	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
L-Alanin	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
L-Asparaginsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bacto Agar	Difco, Detroit, Michigan, USA
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	Roth, Karlsruhe
Collagen R solution	Serva, Heidelberg
Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid (DMF)	Fluka, Buchs SG, Schweiz
DNA Längenstandards	1kbp Leiter, Invitrogen, Karlsruhe 100bp Leiter Pharmacia, Amersham, GE Healthcare, Solingen
Ethanol 100% (v/v)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (100ml)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure	
Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Erythrozyten-Lysepuffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fibronectin	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Formaldehyd säurefrei 37% (v/v)	Roth, Karlsruhe
Fruktose	Merck, Darmstadt
D(+)-Glukose Monohydrat	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Roth, Karlsruhe
L-Glutaminsäure	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Hoechst 33342	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Isopropanol	Hedinger, Stuttgart über Apotheke Universitäts-Klinikum Mainz
Kaliumacetat (KAc)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe

---

Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Karlsruhe
<i>Low density lipoproteins (LDL)</i>	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O)	Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol (β-ME)	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
2-Methyl-2-Butanol	Fischer, Schwerte
Methylzellulose	Fluka, Buchs SG, Schweiz
Natriumacetat (NaAc)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumbutyrat (SB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O)	Roth, Karlsruhe
NycoPrep Universal	Progen, Heidelberg
Optiprep	Progen, Heidelberg
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Poly(dA-dT)*Poly(dA-dT)	Amersham, GE Healthcare, Solingen
Oligonukleotide	
Propidiumjodid	BD Biosciences, Heidelberg
Proteinase K	Roche, Mannheim
Roti-Phenol	Roth, Karlsruhe
Roti-Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe
ROX	TIB MOLBIOL, Berlin
Salzsäure (HCl) 25%	Merck, Darmstadt
Saccharose	Roth, Karlsruhe
L-Serin	Roth, Karlsruhe
Silikon Lösung	Serva, Heidelberg
L-Threonin	Roth, Karlsruhe
2, 2, 2-Tribromoethanol	Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris	Roth, Karlsruhe
Trichostatin A (TSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypanblau	Biochrom, Berlin
Trypsin	Serva, Mannheim
Trypsin/EDTA	PAA, Cölbe
TÜRK's Lösung	Merck, Darmstadt
Valproinsäure (VPA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Wasserstoffperoxyd 30% (v/v) (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
X-Gal	Roth, Heidelberg
Yeast extract Servabacter	Serva, Heidelberg



### 2.1.4 Kits

RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden; Nr. 74104
RNeasy Plus Mini Kit	QIAGEN, Hilden; Nr. 74134
DNeasy Tissue Kit	QIAGEN, Hilden; Nr. 69506
QIAamp DNA Blood Mini Kit	QIAGEN, Hilden; Nr. 51106
QIAGEN PCR Cloning Kit	QIAGEN, Hilden; Nr. 231124
QIAGEN Plasmid Mini Kit	QIAGEN, Hilden; Nr. 12125
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden, Nr. 12163
Qiaquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden; Nr. 28704
QIAshredder	QIAGEN, Hilden; Nr. 79656
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	QIAGEN, Hilden; Nr. 204143
QuantiTect Probe PCR Kit	QIAGEN, Hilden; Nr. 204343
QIAGEN OneStep RT-PCR Kit	QIAGEN, Hilden; Nr. 210212
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche, Mannheim; Nr. 11 732 676 001
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche, Mannheim; Nr. 11 796 828 001
High Pure Viral Nucleic Acid Kit	Roche, Mannheim, Nr. 11 858 874 001
LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I	Roche, Mannheim; Nr. 12 158 817 001
MEGAscript SP6 Kit	Ambion, Woodward; Nr. 1330
TaqMan Universal PCR Master Mix, no UNG	Applied Biosystems, Darmstadt; Nr. 4324018

### 2.1.5 Enzyme

Alle enzymatischen Reaktionen erfolgten in den von den Herstellern angegebenen, bzw. mitgelieferten Puffern bei definierten Temperaturen.

<i>Calf Intestinal Phosphatase</i> (CIP)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.; Nr. M0290L
Kollagenase Typ IV	Sigma-Aldrich; Nr. C5138
Kollagenase A	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim; Nr. 10103586/001
Kollagenase NB 4	Serva, Heidelberg; Nr. 17454.02
DNase I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim; Nr. 11284932001
DNase I (RNase frei)	QIAGEN, Hilden, Nr. 79254
Heparinase	Heparinase II, Sigma-Aldrich; Nr. H6512
T4 DNA Ligase	Fermentas GmbH, St-Leon-Rot; Nr. EL0335
HotStar Taq DNA Polymerase	QIAGEN, Hilden; Nr. 203205
ProofStart DNA Polymerase	QIAGEN, Hilden; Nr. 202205
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M. Fermentas GmbH, St.Leon-Rot

RNase (DNase frei)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim; Nr. 11119915001
Taq DNA Polymerase	QIAGEN, Hilden; Nr. 201205
Uracil-DNA Glykosylase	Roche, Mannheim; Nr. 11 775 367 001

## 2.1.6 Antikörper

Alle *Micro-Beads* gekoppelten MACS Antikörper wurden von Miltenyi Biotec, (Bergisch Gladbach), alle FACS Antikörper von Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach), Serotec (Düsseldorf) oder BD Biosciences (Heidelberg) bezogen.

### 2.1.6.1 FACS Antikörper

Bezeichnung	Klon	Isotyp	Eingesetzte Menge	Quelle
APC-anti-Maus CD11c	N418	Hamster IgG	10µl (1x10 <sup>7</sup> Zellen)	Miltenyi Biotec, Nr. 130-091-844
APC-anti-Biotin	Bio3-18E7	Maus IgG1	10µl (1x10 <sup>7</sup> Zellen)	Miltenyi Biotec, Nr. 130-090-856
APC-anti-Maus MHCII	M5/114	Ratte IgG2b	10µl (1x10 <sup>7</sup> Zellen)	Miltenyi Biotec, Nr. 130-091-806
anti-Maus CD16/CD32	2.4G2	Ratte IgG2b	1µg (1x10 <sup>6</sup> Zellen)	BD Biosciences, Nr. 553142
Biotin-anti-Maus ME-9F1	ME-9F1	Ratte IgG2a	1µl (1x10 <sup>7</sup> Zellen)	Prof. Hamann, Berlin
FITC-Annexin V	-	-	5µl (1x10 <sup>5</sup> Zellen)	BD Pharmingen, Nr. 556419
FITC-anti-Maus CD4	GK1.5	Ratte IgG2b	10µl (1x10 <sup>7</sup> Zellen)	Miltenyi Biotec, Nr. 130-091-608
FITC-anti-Maus CD11b	M1/70.15.11.5	Ratte IgG2b	10µl (1x10 <sup>7</sup> Zellen)	Miltenyi Biotec, Nr. 130-081-201
FITC-anti-Maus CD11c	N418	Hamster IgG	10µl (1x10 <sup>7</sup> Zellen)	Miltenyi Biotec, Nr. 130-091-842
FITC-anti-Maus CD31	390	Ratte IgG2a	1µg (1x10 <sup>6</sup> Zellen)	BD Biosciences, Nr. 558738
FITC-anti-Maus CD45R	RA3-6B2	Ratte IgG2a	10µl (1x10 <sup>7</sup> Zellen)	Miltenyi Biotec, Nr. 130-091-829
FITC-anti-Maus CD106	429 (MVCAM.A)	Ratte IgG2a	1µg (1x10 <sup>6</sup> Zellen)	BD Biosciences, Nr. 553332
FITC-anti-Maus LSEC	ME-9F1	Ratte IgG2a	10µl (1x10 <sup>7</sup> Zellen)	Miltenyi Biotec, Nr. 130-092-026
FITC-anti-Maus ME-9F1	ME-9F1	Ratte IgG2a	1µl (1x10 <sup>7</sup> Zellen)	Prof. Hamann, Berlin
FITC-anti-Maus MHCII	M5/114	IgG2b	10µl (1x10 <sup>7</sup> Zellen)	Miltenyi Biotec, Nr. 130-081-601
FITC-FASER Kit	-	-	10µl (1x10 <sup>7</sup> Zellen)	Miltenyi Biotec, Nr. 130-091-763
PE-anti Maus CD11b	M1/70.15.11.5	Ratte IgG2b	10µl (1x10 <sup>7</sup> Zellen)	Miltenyi Biotec, Nr. 130-091-240
PE-anti-Maus	RA3-6B2	Ratte IgG2a	10µl (1x10 <sup>7</sup> Zellen)	Miltenyi Biotec, Nr. 130-091-828

CD45R				
PE-anti-Maus TCR- $\beta$ Kette	H57-597	Hamster IgG2	1 $\mu$ g (1x10 <sup>6</sup> Zellen)	BD Biosciences, Nr. 553172
PE-Cy5-anti-Maus CD4	RM4-5	Ratte IgG2a	1 $\mu$ g (1x10 <sup>6</sup> Zellen)	BD Biosciences, Nr. 553050
RPE-anti-Maus CD31	390	Ratte IgG2a	1 $\mu$ l (1x10 <sup>6</sup> Zellen)	Serotec, Nr. MCA1364PE

### 2.1.6.2 *Micro-Beads* gekoppelte MACS Antikörper

Bezeichnung	Klon	Isotyp	Produktnummer
anti-Biotin MicroBeads			130-090-485
anti-FITC MicroBeads			130-048-701
anti-Maus anti-LSEC MicroBeads	ME-9F1	Ratte IgG2a	130-092-007
anti-Maus CD4 (L3T4) MicroBeads	GK1.5	Ratte IgG2b	130-049-201
anti-Maus CD11b MicroBeads	M1/70.15.11.5	Ratte IgG2b	130-049-601
anti-Maus CD11c MicroBeads	N418	Hamster IgG	130-052-001
anti-Maus CD45R MicroBeads	RA3-6B2	Ratte IgG2a	130-049-501
anti-Maus MHCII MicroBeads	M5/114	Ratte IgG2b	130-052-401
Basic MicroBeads			130-048-001

## 2.2 Virus

Zur Infektion von Versuchstieren und Zellkulturen wurde ausschließlich der Laborstamm des murinen Cytomegalovirus (mCMV, *Smith strain*, ATCC VR-1399, *mouse salivary gland virus*) (Smith, 1954) verwendet. Von diesem Virusstamm ausgehend wurde das gesamte mCMV Genom sequenziert (Rawlinson et al., 1996) und vorhergesagte ORFs experimentell bestätigt (Tang et al., 2006).

## 2.3 Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden in der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der klinisch-theoretischen Institute der Universität Mainz unter SPF (*specified pathogen free*) Bedingungen gezüchtet. Für die Versuche wurden ausschließlich männliche und weibliche Mäuse des murinen Inzuchtstammes BALB/cJ mit dem Haplotyp H-2<sup>d</sup>, welcher in MHC Klasse I-Loci für die Moleküle K<sup>d</sup>, D<sup>d</sup>, und L<sup>d</sup> kodiert, verwendet. Die Genehmigungsnummern der Bezirksregierung Rheinhessen-Pfalz für alle tierexperimentellen Arbeiten waren 1.5177-07/021-28 (alte Nummer) und 1.5177-07-04/051-62 (neue Nummer).

## 2.4 Tierexperimentelle Methoden

### 2.4.1 Immunsuppression

Für alle Versuche wurden 8 bis 10 Wochen alte weibliche BALB/cJ Mäuse verwendet, welche in einer Kleintierbestrahlungsanlage (zwei  $^{137}\text{Cs}$  Quellen) mit einer Dosis zwischen 6 und 8 Gray (Gy) bestrahlt wurden. Die jeweilige Dosis wurde monatlich entsprechend der Halbwertszeit von  $^{137}\text{Cs}$  ( $T_{1/2}=30\text{a}$ ) angepasst. Die  $\gamma$ -Bestrahlung führt zu einer Aplasie des Knochenmarks durch Auslöschung hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen (Mutter et al., 1988).

### 2.4.2 Intraplantare mCMV Infektion

Ein Virusstock des mCMV wurde auf eine Konzentration von  $1 \times 10^5$  PFU in 25  $\mu\text{l}$  PBS eingestellt und bis zur Injektion auf Eis gekühlt. Davon wurden 50  $\mu\text{l}$  injiziert, um sicherzugehen, dass mindestens  $1 \times 10^5$  PFU übertragen wurden. Die tatsächliche Infektionsdosis betrug bei Applikation zwischen  $1 \times 10^5$  und  $2 \times 10^5$  PFU pro Tier. Den Mäusen wurde das Virus mit einer 1ml Spritze und Kanülen der Dicke 0,4x12 mm intraplantar in die rechte Hinterpfote injiziert. In immunsupprimierten Tieren waren nach einer Woche eine deutliche Hämorrhagie und eine lokale Schwellung der rechten Hinterpfote sichtbar.

### 2.4.3 Experimentelle Knochenmarktransplantation und Infektion

Das murine KMT Modell ist sehr gut geeignet, um die Pathogenese einer mCMV Infektion experimentell zu untersuchen (Koszinowski et al., 1990; Reddehase et al., 1991). In diesem Modell wurde das hämatopoetische System der Empfängermäuse durch Bestrahlung zerstört und zur anschließenden Rekonstitution Knochenmarkzellen (KMZ) von Spendermäusen transplantiert. Nach Transplantation erfolgte die Infektion mit mCMV.

#### Benötigtes Material:

- 10ml, 2ml und 1ml Spritzen
- Kanülen (0,4x12mm und 0,45x12mm)
- PBS + 2% FCS
- PBS
- gereinigtes mCMV

### 2.4.3.1 Isolierung von Knochenmarkzellen

Als KMZ-Spender wurden männliche BALB/cJ verwendet, die im Gegensatz zu den Empfängern nicht zwingend 8 bis 10 Wochen alt sein mussten. Nach zervikaler Dislokation oder CO<sub>2</sub>-Begasung wurden die Spendertiere zur Desinfektion kurz in 70%iges Ethanol getaucht. Die Hinterbeine wurden beidseitig entfernt, wobei der Femurknochen von der Hüftgelenkpfanne abgetrennt wurde. Danach wurden Femur und Tibia freipräpariert und in PBS Lösung gesammelt, um ein Austrocknen zu verhindern. Nach dem Abschneiden der Epiphysen wurden die Markhöhlen der Knochen mit Hilfe einer 0,4x12mm Kanüle mit PBS + 2% FCS gespült und das Knochenmark aufgefangen. Das gesammelte Knochenmark wurde zweimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation 10min bei 1200U/min, bzw. 300xg Megafuge 2.0) und anschließend über ein 100µm Zell-Nylonsieb filtriert. Nach der Zellzählung (erwartete Zellzahl: 1 bis 3x10<sup>7</sup> Knochenmarkzellen pro Maus, jeweils zwei Tibien und Femuren) wurden die Zellen für die spätere Transplantation auf eine definierte Zellzahl (für KMT 1x10<sup>7</sup> Zellen/ml) in PBS ohne Zusätze eingestellt.

### 2.4.3.2 Bestrahlung der Rezipienten, Knochenmarktransplantation und Infektion

Die Rezipientenmäuse wurden zur Immunsuppression mit einer Dosis von 6,5Gy bestrahlt (siehe 2.4.1). Drei bis vier Stunden nach Bestrahlung wurden die KMZ den Mäusen mit einer Konzentration von 5x10<sup>6</sup> KMZ in 500µl PBS intravenös (i.v.) in die Schwanzvene injiziert. Nach Knochenmarkgabe wurden die Mäuse wie unter 2.4.2 beschrieben mit mCMV intraplantar infiziert.

### 2.4.4 Blutentnahme aus der Schwanzvene

#### EDTA Lösung

EDTA*2H <sub>2</sub> O	86nM	372,24g/mol	6,4g
		mit PBS ad	200ml

Vor der Blutentnahme wurden die Mäuse zur Gefäßweitung unter eine Wärmelampe gesetzt und bekamen anschließend die Schwanzvene mit einem spitzen Skalpell punktiert. Austretendes Blut wurde mit einer in zuvor mit EDTA gespülten Pipettenspitze abgezogen und in ein Reaktionsgefäß überführt, in welches 5µl EDTA Lösung vorgelegt war. Pro Maus wurden zwischen 20µl und 200µl Blut entnommen. Zur späteren DNA Isolierung (siehe 2.10.1.3) wurden die Ansätze mit PBS auf 200µl eingestellt und bis zur Aufreinigung bei -20°C gelagert.

## 2.4.5 Leberperfusion zur anschließenden Hepatozytenisolierung

Avertin für Betäubung:

### Stocklösung

2,2,2-Tribromethanol	282,78g/mol	10g
Tert-amyl-Alkohol (2-Methyl-2-butanol)		10ml

Ansatz 10min vortexen, 1 Jahr haltbar bei 4°C in Alufolie verpackt.

### Gebrauchslösung (2,5%)

25µl Stocklösung ad 1ml PBS

Ansatz 10min vortexen, ca. 3 Wochen haltbar bei 4°C in Alufolie verpackt.

Anwendung: 450 bis 550µl pro Maus intraperitoneal (i.p.)

### Puffer I (Ca<sup>2+</sup>-frei)

NaCl	58,44g/mol	8,3g
KCl	76,56g/mol	0,5g
Hepes	238,31g/mol	2,4g

pH 7,4 einstellen, ad 1l mit *Aqua bidest* auffüllen und steril filtrieren.

### Puffer II (Kollagenase Puffer)

NaCl	58,44g/mol	3,9g
KCl	76,54g/mol	0,5g
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	147,02g/mol	0,7g
Hepes	238,31g/mol	24g

pH 7,6 einstellen, ad 1l mit *Aqua bidest* auffüllen.

Vor Gebrauch 0,05% Kollagenase (50mg/100ml; Kollagenase NB4, Serva, Heidelberg) dazugeben und steril filtrieren (zuerst über 0,45µm Filter, dann über 0,22µm).

### Puffer III (Waschpuffer)

NaCl	58,44g/mol	8,3g
KCl	76,54g/mol	0,5g
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	147,02g/mol	0,18g
Hepes	238,31g/mol	2,4g

pH 7,4 einstellen, ad 1l mit *Aqua bidest* auffüllen und steril filtrieren.

### Benötigtes Material:

- Braunüle 1,2mm (blau)
- Peristaltikpumpe
- Wasserbad
- Zwirn
- 1ml Spritze
- Kanüle (0,4x12mm)
- Mull (steril)
- PBS

- Puffer I-III auf 37°C vorgewärmt

Zur Narkose wurde der Maus 450 bis 550µl Avertin i.p. injiziert. Es wurde gewartet, bis kein Zwischenzehenreflex mehr vorhanden war, was ein sicheres Zeichen für eine vollständige Betäubung ist. Die Maus wurde fixiert, der Bauch mit 70% Ethanol desinfiziert und mit zwei Schnitten lateral eröffnet. Der Darm wurde zur Seite gelegt, um Blick auf Leber und *Vena portae* zu erhalten. Um die *Vena portae* wurde dann mit Zwirn eine lose Ligatur gelegt, die *Vena portae* mit einer Braunüle punktiert, die anschließend durch die Ligatur fixiert wurde. An die Braunüle wurde der Schlauch der Peristaltikpumpe angeschlossen, wobei strikt darauf zu achten war, dass sich keine Luftblasen im System befanden, was bei der Perfusion zu Stenosen in der Leber führen kann. Die Pumpe wurde mit niedriger Durchflußrate angeschaltet (7-8ml/min) und gleichzeitig die *Vena cava caudalis* durchgeschnitten. Danach wurde die Durchflussgeschwindigkeit auf 20ml/min erhöht. Zuerst wurde die Leber mit 100ml Puffer I, danach mit 50ml Puffer II perfundiert. Alle Puffer wurden vor Gebrauch auf 37°C erwärmt. Nach Perfusion wurde die Leber entnommen und in eine mit Puffer III gefüllte sterile Petrischale überführt.

## 2.4.6 Leberperfusion zur anschließenden Isolierung der gesamten nichtparenchymalen Zellen

### Ca<sup>2+</sup> freies Medium

Substanz	MW g/mol	Stocklösung	Einwaage	Konzentration	2l Ansatz
L-Asparaginsäure	133,1	0,125M	8,32g/500ml	0,1mM	<b>1,6ml</b>
L-Threonin	119,1	0,25M	3g/100ml	0,2mM	<b>1,6ml</b>
L-Serin	105,1	0,5M	5,26g/100ml	0,3mM	<b>1,2ml</b>
Glycin	75,07	1M	7,5g/100ml	0,5mM	<b>1ml</b>
L-Alanin	89,09	1M	8,9g/100ml	0,6mM	<b>1,2ml</b>
L-Glutaminsäure	147,13	0,125M	9,2g/500ml	0,9mM	<b>14,4ml</b>
L-Glutamin	146,15	0,2M	2,932g/100ml	0,9mM	<b>9ml</b>
D(+) Glucose Monohydrat	198,17		3,96g/l	20mM	<b>7,9g</b>
Fructose	180,2	1M	90,1g/500ml	20mM	<b>40ml</b>
Saccharose	342,3		67,4g/l	197mM	<b>134,8g</b>
KCl	74,56	1M	74,6g/l	3mM	<b>6ml</b>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	156,01	0,25M	39g/l	0,7mM	<b>5,6ml</b>
MgCl <sub>2</sub>	203,3	1M	20,3g/l	0,5mM	<b>1ml</b>
Hepes	238,31		2,38g/l	10mM	<b>4,7g</b>
NaHCO <sub>3</sub>	84,01	0,5M	42g/l	24mM	<b>96ml</b>

- Alle Stocklösungen mit *Aqua bidest* herstellen
- L-Asparaginsäure und L-Glutaminsäure in 1N HCl lösen
- L-Glutamin: 2,923g/100ml (200mM), aliquotiert bei -20°C lagern

- pH 7,4 einstellen, ad 2l mit *Aqua bidest* auffüllen und steril filtrieren (0,22µm) und aliquotiert bei -20°C lagern
- Vor Gebrauch mit 0,05% Kollagenase versetzen und auf 37°C erwärmen

### GBSS Puffer

Substanz	MW g/mol	Stocklösung	Einwaage	Konzentration	5l Ansatz
NaCl	58,44	4M	234g/l	137mM	<b>171,5ml</b>
KCl	74,56	1M	74,6g/l	5mM	<b>25ml</b>
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	147,02	1M	14,7g/100ml	1,6mM	<b>8ml</b>
MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	203,3	1M	20,3g/100ml	0,9mM	<b>4,5ml</b>
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	246,48	1M	24,7g/100ml	0,3mM	<b>1,5ml</b>
KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	136,09	1M	13,6g/100ml	0,3mM	<b>1ml</b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	177,99	0,25M	44,5g/l	0,2mM	<b>34ml</b>
NaHCO <sub>3</sub>	84,01	0,5M	42g/l	1,7mM	<b>27ml</b>
D(+) Glucose Monohydrat	198,17		1,09g/l	5,5mM	<b>5,45g</b>
Hepes	238,31		11,9g/l	50mM	<b>59,5g</b>

- pH 7,4 einstellen, ad 5l mit H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> auffüllen, steril filtrieren (0,22µm) und bei 4°C lagern
- Falls GBSS als Perfusionspuffer verwendet wird, Zugabe von 0,05% Kollagenase und auf 37°C erwärmen

### Benötigtes Material:

- Kanüle 0,45x12mm
- Peristaltikpumpe
- Wasserbad

#### **2.4.6.1 Leberperfusion zur anschließenden Isolierung nichtparenchymaler Zellen für Elutriation**

Die Leberentnahme für die Isolierung nichtparenchymaler Zellen wurde nach CO<sub>2</sub>-Begasung oder zervikaler Dislokation der Mäuse durchgeführt. Die Maus wurde desinfiziert und der Bauch, analog zur Hepatozytenisolierung, mit zwei lateralen Schnitten eröffnet. Die *Vena portae* wurde freigelegt und mit einer Kanüle, welche mit der Peristaltikpumpe verbunden war, punktiert. Die Pumpe wurde auf 5ml/min eingestellt, angeschaltet und gleichzeitig die *Vena cava caudalis* durchtrennt. Die Leber wurde für maximal 10 bis 20 sec mit Ca<sup>2+</sup>-freiem Medium + 0,05% Kollagenase (auf 37°C erwärmt) perfundiert, da bei längerer Perfusion die Kupffer Zellen ausgewaschen werden konnten. Wiederum musste darauf geachtet werden, dass das Schlauchsystem vollkommen frei von Luftblasen war. Die Leber wurde entnommen und bis zur weiteren Verwendung in GBSS (RT) gelagert.



#### **2.4.6.2 Leberperfusion zur anschließenden Isolierung nichtparenchymaler Zellen zur LSEC Gewinnung**

Die Entnahme der Leber für die Isolierung nichtparenchymaler Zellen zur anschließenden LSEC Gewinnung geschah analog wie unter 2.4.6.1 beschrieben, allerdings mit dem Unterschied, dass zur Perfusion nicht  $\text{Ca}^{2+}$ -freies Medium, sondern GBSS mit 0,05% Kollagenase (Kollagenase A, Roche) verwendet wurde. Auch konnte die Perfusionszeit etwas erhöht werden (30s), da ein Auswaschen der Kupffer Zellen tolerierbar war.

#### **2.4.6.3 Leberperfusion zur anschließenden Kultivierung von Leberstücken**

Die Entnahme der Leber zur Kultivierung geschah analog zu 2.4.6.1 mit dem Unterschied, dass zur Perfusion auf 37°C angewärmtes PBS verwendet wurde.

#### **2.4.7 LSEC Transplantation**

Isolierte LSEC (siehe 2.4.6.2, 2.5.2, 2.12.1) wurden mit sterilem PBS auf  $5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen pro 500µl eingestellt und mit einer Pipette vorsichtig gemischt, um Verklumpungen der Zellen, welche zu Embolien führen können, zu lösen. Anschließend wurden pro Tier 500µl i.v. in die Schwanzvene injiziert.

#### **2.4.8 Organentnahme und Probenkonservierung**

Nach Begasung durch  $\text{CO}_2$  oder zervikaler Dislokation wurden den Tieren Leber, Milz, KM und die Lunge steril entnommen und je nach Fragestellung weiter behandelt. Des Weiteren wurden zur DNA Gewinnung für Klonierungen ungefähr 0,4 bis 0,6cm der Schwanzspitze abgenommen. Alle Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

### **2.5 Zellbiologische Methoden**

#### **2.5.1 Isolierung von Hepatozyten**

Nach Leberperfusion (siehe 2.4.5) und Entfernen der Gallenblase wurde das Organ unter Zugabe von Puffer III mit zwei Pinzetten ausgestrichen und über steriles Mull oder ein 100µm Zellsieb in ein 50ml Falcon filtriert. Die Hepatozyten wurden für 4min bei 400U/min (~30-40xg, Megafuge 2.0) zentrifugiert, der Überstand abgezogen und das Pellet unter Zugabe von PBS vorsichtig aufgeschüttelt. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 20ml PBS aufgenommen und die Zellen gezählt.

## 2.5.2 Isolierung nichtparenchymaler Zellen via Optiprep oder Nycodenz Dichtegradienten

### Silikonisieren von Glaswaren

Um unspezifisches Anheften von Zellen zu verhindern, wurden die Glaswaren (Erlenmeyerkolben) mit einem Silikonfilm überzogen. Dazu wurde etwas Silikon/Chloroform Lösung (Serva, Heidelberg) in die Kolben gegeben und diese damit komplett benetzt. Anschließend wurde die Silikonlösung abgegossen und die Kolben viermal mit  $H_2O_{demin}$  gespült, bis kein Chloroformgeruch mehr wahrzunehmen war. Die mit der Silikonlösung beschichteten Kolben wurden daraufhin eine Stunde bei  $100^\circ C$  eingebrannt und danach 2 Stunden bei  $180^\circ C$  sterilisiert.

### GBSS+Kollagenase+DNase

Kollagenase A	25mg/ml	0,05%
DNase I (2000U/mg)	10mg/ml	1000-2000U
GBSS (siehe 2.4.5)		30ml

### Optiprep™ Dichtegradientenmedium

30% (w/v) Arbeitslösung herstellen: 1 vol Optiprep™ (60%) + 1 vol GBSS

### Nycoprep™ Dichtegradientenmedium

30% (w/v) Arbeitslösung herstellen: 1 vol Nycoprep™ Universal (60%) + 1 vol GBSS ohne NaCl oder RPMI Medium

### Erythrozyten Lysepuffer

$NH_4Cl$	53,49g/mol	8,3g
	gelöst in 1l Tris Puffer (0,01M Tris)	

### Benötigtes Material:

- Schüttelwasserbad
- GBSS Puffer
- Optiprep
- Metallsieb
- Zellsiebe  $100\mu m$  und  $40\mu m$
- 2ml Spritze

### Dissoziation der Lebern

Die Lebern wurden, wie unter 2.4.6.1 oder 2.4.6.2 beschrieben, perfundiert, entnommen und in GBSS (RT) aufbewahrt. Diese wurden dann zur Dissoziation in eine Petrischale überführt und die Gallenblase und anhängendes Bindegewebe entfernt. Mit einer Pinzette und einer gebogenen Schere wurden die Organe ausgestrichen und weiteres Bindegewebe entfernt. Anschließend wurde die Zellsuspension in GBSS + Kollagenase + DNase aufgenommen (30ml für bis zu acht Lebern) und in einen silikonisierten Erlenmeyerkolben überführt. Dieser wurde für 30

bis 40min bei 250 U/min und 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert, um restliche Gewebeverbände zu dissoziieren und Hepatozyten zu zerstören. Nach der Dissoziation wurde die Suspension über ein Metallsieb mit einem Spritzenstempel passiert und über ein 100µm Zellsieb in 50ml Polystyrol Falcons gegeben. Für 1 bis 3 Lebern waren zwei Falcons ausreichend, für größere Ansätze wurde die Suspension auf 4 Falcons verteilt. Nach einem initialen Zentrifugationsschritt für 10min bei 300xg (RT) wurden die Pellets gelöst und in einem Falcon vereinigt. Danach folgten zwei Waschschriffe mit GBSS für jeweils 10min bei 300xg (RT).

#### OptiPrep™ und Nycoprep™ Dichtegradienten

Zur Isolierung der nichtparenchymalen Zellen wurde eine kontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation mit OptiPrep™ (Ford et al., 1994; Graham et al., 1994) oder Nycoprep™ (Rickwood et al., 1982) durchgeführt.

Nach dem zweiten Waschschrift wurde das Pellet in 6ml GBSS aufgenommen und mit 8ml OptiPrep™ Arbeitslösung vermischt, um einen 17%igen Dichtegradienten zu erhalten. Die Lösung wurde auf zwei 15ml Polystyrol Falcons aufgeteilt und diese mit jeweils 2ml GBSS überschichtet, um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden. Nach Zentrifugation (15min bei 400xg, ohne Bremse auslaufen lassen) wurde die Interphase vorsichtig mit einer 5ml Pipette abgenommen und die Zellen über ein 40µm Zellsieb gegeben. Bevor die Zellen gezählt wurden erfolgte ein erneuter Waschschrift für 10min bei 300xg.

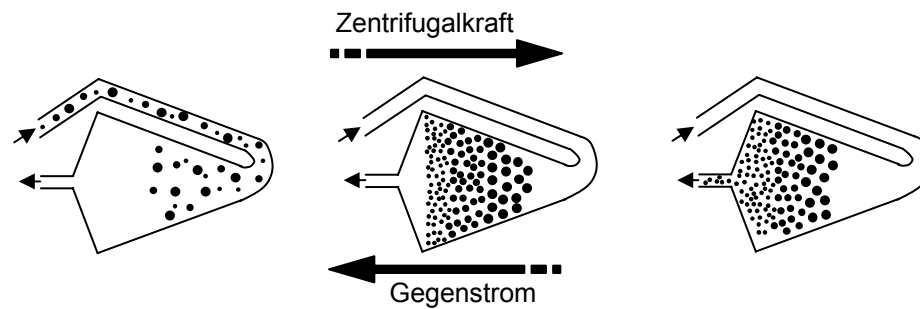
Alternativ dazu konnten die nichtparenchymalen Zellen mit einem Nycoprep™ Gradienten aufgereinigt werden. Dazu wurden die Zellen mit der Nycoprep™ Arbeitslösung auf einen 26%igen Dichtegradienten eingestellt (auf 1ml Zellen 6,5 ml 30% Nycoprep™ geben). Die Lösung wurde in ein 15ml Polystyrol Falcon gegeben, mit 2ml RPMI oder GBSS ohne NaCl überschichtet und für 20min bei 2500 U/min und 4°C ohne Bremse zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde die Interphase mit einer 5ml Pipette abgenommen und die Zellen über ein 40µm Zellsieb gegeben und mit GBSS gewaschen. Bei diesem Ansatz befanden sich nunmehr, im Gegensatz zum OptiPrep™ Gradienten, noch alle Erythrozyten in der Suspension, weshalb nach Isolierung noch eine Erythrozytenlyse vorgenommen wurde. Dazu wurde das Zellpellet in 1ml Lysepuffer aufgenommen, gemischt und eine Minute inkubiert. Nach Inkubation wurde der Puffer mit GBSS ausgewaschen und die Prozedur, falls die Lyse nicht komplett war, gegebenenfalls wiederholt.

### **2.5.3 Isolierung von LSEC und Kupffer Zellen durch Elutriation**

#### Benötigtes Material

- GBSS Puffer
- Blockierungspuffer: PBS + 1% BSA
- Zentrifuge J2-MC
- Elutriationsrotor Beckman HE-6B
- 6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Lösung
- 10ml Spritze

Die Elutriation (Gegenstromzentrifugation) erlaubt eine effiziente Zelltrennung aufgrund der Zellgröße und -dichte. Mittels einer peristaltischen Pumpe und einem angeschlossenen Schlauchsystem wird die zu separierende Zellsuspension zuerst in einen Bypass und dann bei laufender Zentrifuge in einen speziellen Rotor eingeschleust. Die Fließrichtung wirkt in diesem System der Zentrifugalkraft entgegen (Zentripetalkraft). Mit steigender Flussrate können nun zunehmend größere und schwerere Zellen die Zentrifugalkraft überwinden, werden ausgespült (siehe Abb. 2.1) und können gesammelt werden (Lutz et al., 1992).



#### Abb. 2.1 Elutriationsprozess in der Gegenstromzentrifugation

Nachdem die zu trennende Zellsuspension eingeleitet wurde, ordnen sich die Zellen bei gleichbleibender Zentrifugations- und Gegenstromgeschwindigkeit ihrer Größe nach in der Kammer an. Durch Erhöhung der Flussrate bzw. Erniedrigung der Zentrifugationsgeschwindigkeit können Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Sedimentation ausgespült werden.

Der Rotor wurde nach Herstellerangabe zusammengesetzt, an das Pumpensystem angeschlossen und auf Dichtigkeit geprüft. Das komplette Schlauchsystem wurde kurz mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ , anschließend mit 70% Ethanol gespült und für 30min mit Blockierungspuffer gefüllt um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Nach Inkubation wurde der Blockierungspuffer und noch vorhandene Luftblasen mit GBSS Puffer ausgespült, die Pumpe auf eine Flussgeschwindigkeit von 16ml/min eingestellt und die Zentrifuge gestartet (2500 U/min, 25°C). Für die Zugabe der Proben wurde der Bypass geschlossen, die Zellsuspension (2.5.2) in einer 10ml Spritze aufgezogen und in den Bypass injiziert. Beim Anhängen der Spritze wurde kurz aspiriert, um die Einfuhr von Luftblasen in das System zu vermeiden. Danach wurde der Bypass geöffnet und die Suspension ins System eingespült. Zum Aufbau des Zellgradienten wurden 100ml GBSS Puffer mit einer Flussgeschwindigkeit von 16ml/min durchgespült. Der Durchlauf wurde gesammelt und die Flussgeschwindigkeit sukzessiv erhöht. Folgende Volumina wurden je eingestellter Flussrate gesammelt:

Durchflussgeschwindigkeit	Fraktion	Menge
16ml/min	Erythrozyten/Lymphozyten	100ml
22ml/min	LSEC	100ml
32ml/min	LSEC und Kupffer Zellen	50-100ml
55ml/min	Kupffer Zellen	50-100ml

Die Zellsuspensionen wurden anschließend zentrifugiert (10min, 300xg, 4°C) und den jeweiligen Fragestellungen entsprechend weiter verwandt.

## 2.6 Zellkulturmaterialien

Alle aufgeführten Medien, Zusätze und Lösungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit *Aqua bidest* angesetzt und bei Bedarf über einen 0,2µm Membranfilter steriltfiltriert. Die Lagerung erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 4°C.

### 2.6.1 Medienzusätze und Reagenzien

**Fetales Kälberserum (FCS)** wurde von der Firma PAA Laboratories (Cölbe) bezogen und bei -20°C gelagert. Vor Gebrauch wurde das Serum bei 4°C aufgetaut und anschließend für 30-45min bei 56°C im Wasserbad zur Komplementinaktivierung inkubiert. Das inaktivierte FCS wurde entweder bei 4°C oder aliquotiert bei -20°C aufbewahrt.

**L-Glutamin** wurde ebenfalls von PAA Laboratories (Cölbe) bezogen und aliquotiert zu 5ml (200mM in 0,9% (w/v) NaCl) bei -20°C gelagert. Pro 500ml Zellkulturmedium wurde ein Aliquot L-Glutamin zugesetzt (Endkonzentration: 2mM).

**Methylcellulosemedium** wurde in 360ml *Aqua bidest* (8,8g Methylcellulosemedium) mit einem Magnetrührer suspendiert, autoklaviert und über Nacht bei 4°C unter Rühren gelöst. Nach Zugabe von 40ml 10x MEM, 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin, 5% (v/v) FCS und Einstellen des pH-Wertes auf pH 7,5 mit NaHCO<sub>3</sub> (Stocklösung 55g/l) war das Medium gebrauchsfertig. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

**Penicillin/Streptomycin** wurden in Kombination gegen grampositive und gramnegative Bakterien eingesetzt. Eine Stocklösung, bestehend aus 10000U Penicillin und 10mg/ml Streptomycin in 0,9% (w/v) NaCl wurde von PAA Laboratories (Cölbe) bezogen. Die Stocklösung wurde in 5ml Aliquots bei -20°C gelagert und bei Bedarf dem Medium zugesetzt (Endkonzentration: 100U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin).

**TÜRK's Lösung** wurde verwendet, um mononukleäre Zellen auszuzählen. Die Erythrozyten werden durch die in der Lösung enthaltene Essigsäure hämolysiert und die Kerne der kernhaltigen Zellen durch den enthaltenen Farbstoff angefärbt.

**Trypanblau** ist ein saurer Farbstoff, der als Anion sehr leicht an Proteine binden kann (Lindl, 2002). Trypanblau wird von toten Zellen sofort aufgenommen, was zu einer Blaufärbung des Zytosols führt. Dies ermöglicht eine Unterscheidung von lebenden und toten Zellen und damit eine Bestimmung der Lebendzellzahl. Lebende Zellen sind einige Zeit (ca. 5-10min) für den Farbstoff impermeabel.

**Trypsin/EDTA** wurde von PAA Laboratories (Cölbe) bezogen und zum Ablösen von adhären Zellen verwendet. Die Lösung wurde 1:10 mit PBS verdünnt angesetzt (Endkonzentration: 0,5g/l Trypsin, 0,2g/l EDTA, pH 7,4-7,6).

## 2.6.2 Zellkulturmedien

Die käuflichen RPMI-, DMEM- und MEM-Medien enthalten Phenolrot als pH-Indikator, welches bei pH 7,4 eine hellrote Färbung hervorruft. Durch zelluläre Stoffwechselprozesse sinkt der pH-Wert des Mediums ab und die Farbe wechselt über orange zu gelb. Auf diese Weise kann sehr einfach die Qualität des Mediums kontrolliert werden. Alle Zellkulturmedien wurden von den Firmen Gibco-BRL (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) oder PAA Laboratories (Cölbe) bezogen und wie folgt supplementiert:

### **DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*):** Nr. E15-005

FCS	10% (v/v)
L-Glutamin	2mM
Penicillin	100U/ml
Streptomycin	0,1mg/ml

### **MEM (*Minimum Essential Medium*):** Nr. 21090-022 und Nr. 31095-029 (mit GlutaMAX™)

MEM musste mit L-Glutamin supplementiert werden, wobei L-Glutamin in MEM + GlutaMAX™ in stabilisierter Form vorhanden war.

FCS	10% (v/v)
L-Glutamin	2mM
Penicillin	100U/ml
Streptomycin	0,1mg/ml

### **MEM 10x (*Minimum Essential Medium*):** Nr. 21430-020

Zehnfach konzentriertes MEM Medium zum Ansetzen der Methylcellulose (2.6.1)

**PBS-Puffer (*Phosphate Buffered Saline*):** PBS Puffer wurde von der Apotheke des Klinikums der Universität Mainz bezogen (DPBS, Biowhittaker Europe, Vervies, Belgien).

NaCl	136mM
KCl	26mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	8mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5mM

### **RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*):** Nr. 31870-025

FCS	10% (v/v)
L-Glutamin	2mM
HEPES	25mM
Penicillin	100U/ml
Streptomycin	0,1mg/ml

## 2.7 Zell- und Gewebekulturmethoden

Zur Verhinderung von Kontaminationen der Zell- und Gewebekulturen mit Bakterien oder Pilzen wurden alle Zellkulturarbeiten an einer sterilen Werkbank und Verwendung steriler Glas- und Plastikgeräte durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in CO<sub>2</sub>-Inkubatoren (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre. Dadurch wurden die physiologischen pH-Werte der CO<sub>2</sub>/Bicarbonat-gepufferten Medien aufrechterhalten.

### 2.7.1 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Einfriermedium: 90% FCS (v/v), 10% DMSO (v/v)

Um Zellen langfristig zu lagern, werden sie bei -196°C in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das im Einfriermedium enthaltene DMSO verhindert durch seine hygroskopischen Eigenschaften die Bildung von Eiskristallen, die Zellen beim Einfrieren schädigen können. Zum Einfrieren wurden die zuvor pelletierten Zellen mit kaltem Einfriermedium auf eine Zellzahl von 1 bis 5x10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt. Aliquots von 1ml wurden in sterile Kryoröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden in mit Papier ausgelegten Plastikboxen bei -70°C eingefroren und am nächsten Tag zur Lagerung in die Dampfphase von flüssigem Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die eingefrorenen Zellen im 37°C Wasserbad schnell aufgetaut und sofort in 50ml Kulturmedium verdünnt, um vorhandenes DMSO auszuwaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugieren pelletiert, erneut in Kulturmedium aufgenommen und schließlich in Zellkulturplatten ausgesät.

### 2.7.2 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Farbstoffe Trypanblau und TÜRK'S Lösung (2.6.1) verwendet. Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension in einem definierten Verhältnis mit dem Farbstoff gemischt. In einer Neubauer Zählkammer (Kammertiefe 0,1mm) wurden alle Zellen, die sich im Großquadrat (geteilt in 25 Kleinquadrate) befanden, ausgezählt. Um einen Fehler bei der Berechnung möglichst gering zu halten, wurde die Verdünnung der Zellsuspension nach Möglichkeit so ausgewählt, dass mindestens 50 Zellen/Großquadrat gezählt wurden. Mit folgender Formel lässt sich die Zellzahl pro ml Zellsuspension bestimmen:

$$N/n \times V \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

N	=	Zahl der gezählten Zellen (in allen Großquadraten)
n	=	Zahl der ausgezählten Großquadrate
V	=	Verdünnungsfaktor
10 <sup>4</sup>	=	Kammerfaktor

### 2.7.3 Anlage von murinen embryofetalen Fibroblasten

Zur Virusproduktion und als Indikatorzellen für Plaqueassays wurden murine embryofetale Fibroblasten (MEF) verwendet, die für eine Infektion mit mCMV suszeptibel sind.

#### Benötigtes Material:

- Steriler 300ml Erlenmeyerkolben mit Glaskugeln (Ø 1-2mm) und magnetischer Rührfisch
- Steriles Metallsieb
- 100µm Zellsiebe
- PBS
- MEM + 5% FCS
- Einfriermedium (siehe 2.7.1)
- Trypsin/EDTA Lösung pH 6,4

Trypsin 1,25g

EDTA\*2H<sub>2</sub>O 1,25g

mit PBS ad 1000ml auffüllen, pH-Wert mit 1M NaOH auf 6,4 einstellen und steril filtrieren. Die Lösung ist bei 4°C mehre Monate haltbar.

Einer trächtigen Maus wurden am 17. Tag der Schwangerschaft die Föten steril entnommen und diese sofort in einer Petrischale auf Eis gestellt. Nachdem die inneren Organe sowie die Augenanlagen der Embryonen entfernt wurden, wurde das verbliebene Gewebe mit einer Schere klein geschnitten und anschließend mit 2 Skalpellen feiner zerkleinert. Danach wurde der Gewebebrei in kaltem PBS aufgenommen, über ein Metallsieb gegeben und mit PBS nachgespült. Durch mehrmaliges Waschen wurden vorhandene Erythrozyten entfernt. Der Gewebebrei wurde anschließend mit Hilfe eines Löffels in einen mit Glaskugeln befüllten Erlenmeyerkolben gegeben und in je 15ml Trypsin/EDTA Lösung und 15ml PBS aufgenommen. Nach langsamem Rühren für jeweils 30min bei 37°C wurden noch zweimal 15ml Trypsin/EDTA und 15ml PBS Lösung zugegeben und für 30min bei 37°C weitergerührt. Nach insgesamt 1½ Stunden wurde der Überstand abgenommen, über ein 100µm Zellsieb gegeben und abzentrifugiert (10min bei 1200 U/min, 302xg, Megafuge 2.0). Das Pellet wurde in 10ml Medium aufgenommen und zentrifugiert. Danach wurde der Überstand erneut dekantiert, das Pellet in 10ml Medium resuspendiert, ein weiteres Mal über ein Zellsieb gegeben und anschließend die Zellzahl bestimmt.

Die Aussaat der Primärzellen erfolgte in Petrischalen (Ø 14,5cm) in einer Dichte von  $2-3 \times 10^7$  Zellen pro 30ml (Passage 0). Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen dreimal mit jeweils 10ml PBS vorsichtig gespült, um alle nicht adhärenen Zellen, wie z.B. Erythrozyten, zu entfernen. Nachdem sich nach 2 bis 4 Tagen ein konfluenter Zellrasen gebildet hatte, wurden die Zellen abgeerntet und entweder in Einfriermedium (90% FCS + 10% DMSO) weggefroren (3-4 Aliquots pro Ø 14,5cm Petrischale) oder durch Teilen (1:3 oder 1:4) in die erste Passage überführt. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und danach mit 3ml Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen ablösten (Kontrolle unter Invertmikroskop). Die Zellsuspension wurde in



Medium mit 5% FCS (Trypsin wird durch Proteaseinhibitoren des FCS inaktiviert) aufgenommen, einmal gewaschen und in neuen Kulturschalen ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz konnten die MEF in der ersten Passage weggefroren oder durch Teilen in die zweite Passage überführt werden. Zur Produktion von gereinigtem mCMV (siehe 2.8.1) wurden nur MEF bis zur dritten Passage verwendet.

## 2.7.4 Kultivierung und Reinheitsbestimmung von LSEC

### 2.7.4.1 Beschichtung von Oberflächen mit Kollagen

Die Kollagenlösung (Kollagen R, 2mg/ml; Serva) wird 1:10 mit sterilem *Aqua bidest* verdünnt, auf den Böden der Zellkulturschalen gleichmäßig verteilt (für 24-*well* Platten: 200-400µl der verdünnten Lösung) und unter der Sterilbank für 2h inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit abgezogen und die Platten getrocknet. Die Platten wurden bis zur Verwendung lichtundurchlässig in Aluminiumfolie gepackt gelagert. Die Beschichtung von Deckgläsern mit Kollagen geschah analog in 24-*well* Platten.

### 2.7.4.2 Beschichtung von Oberflächen mit Fibronectin

Um Zellen auf Deckgläsern wachsen zu lassen, wurden diese entweder mit Kollagen (siehe 2.7.4.1) oder mit Fibronectin beschichtet. Dazu wurde Fibronectin in sterilem *Aqua bidest* aufgenommen und auf 1mg/ml eingestellt. Als Gebrauchslösung wurde der Stock mit sterilem PBS oder Medium auf 50µg/ml Endkonzentration eingestellt. Die Deckgläser wurden in 24-*well* Platten gelegt und mit 200µl Fibronectin Lösung (pro 1cm<sup>2</sup> Fläche 100µl Lösung) beschichtet. Nach 45min Inkubation bei RT (Deckgläser dürfen nicht austrocknen) konnte der Überstand abgezogen und die in den Platten befindlichen Deckgläser direkt verwendet werden.

### 2.7.4.3 LSEC Kultivierung

Nach Isolierung der LSEC (siehe 2.5.2 und 2.12.1) wurden diese in DMEM (siehe 2.6.2) aufgenommen und in die mit Kollagen beschichteten Platten mit einer Dichte von  $2 \times 10^7$  Zellen pro 24-*well* Platte ( $8 \times 10^5$  Zellen pro *well*) oder  $2,4 \times 10^7$  Zellen pro 6-*well* Platte ( $4 \times 10^6$  Zellen pro *well*) ausplattiert.

### 2.7.4.4 Reinheitsbestimmung von LSEC

#### Fixierungspuffer

Paraformaldehyd (PFA)	8% (w/v)
Saccharose	8% (w/v)

PFA und Saccharose 1:1 mischen, um 4% (w/v) PFA/Saccharose zu erhalten.

Die Reinheitsbestimmung der isolierten LSEC erfolgt über die Kontrolle der Aufnahme von acetyliertem *low density lipoprotein* (LDL). Durch Acetylierung der Lysinreste des LDL können die Lipoproteine nicht mehr an den zellulären LDL-Rezeptor binden (Weisgraber et al., 1978), werden aber noch von Endothelzellen über für modifiziertes LDL spezifische Scavengerrezeptoren internalisiert (Brown et al., 1979). Mittlerweile wird dieser Test routinemäßig angewandt, um Endothelzellen in primären Zellkulturen zu identifizieren (Voyta et al., 1984).

Für Fluoreszenzmikroskop-Analysen wurden die Zellen auf Deckgläsern in 24-well Platten ausgesät (siehe 2.7.4.2) und mit 1,5µl fluoreszenzmarkiertem acetylierten LDL (AcLDL) über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Aufnahme des AcLDL unter dem Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Dazu wurden die Ansätze zweimal mit PBS gewaschen und mit PFA/Saccharose für 20min fixiert. Danach wurde die Fixierlösung einmal mit PBS abgewaschen und Zellen mit Hoechst 33342 (1:5000 in *Aqua bidest*) für maximal 5min gefärbt. Nach der Färbung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und die Deckgläser auf Objektträger überführt und darauf fixiert.

## 2.7.5 Kultivierung von Gewebeexplantaten

Zur Kultivierung von Geweben wurden Leber, Lunge und Milz verwendet. Diese Organe wurden aus den Mäusen steril entnommen, wobei die Leber vor der Entnahme für 5 bis 10sec mit sterilem PBS perfundiert wurde (siehe 2.4.6.3). Nach Entnahme wurden die jeweiligen Organe in PBS oder Medium gelagert, um ein Austrocknen zu verhindern. Die Organe wurden mit einem Skalpell in kleine Stückchen von maximal 3mm Kantenlänge (Gewicht ~5-10mg) geteilt und in 24-well Platten gegeben (pro well ein Stückchen), in die 1ml Medium (MEM mit Zusätzen) pro well vorgelegt wurde. Standardmäßig wurde alle vier Tage aus jedem well 500µl Medium entnommen und durch frisches Medium ersetzt.

## 2.8 Virologische Methoden

### 2.8.1 mCMV Produktion

#### Virus Standard Puffer (VSP)

Tris	50mM	6,1g
EDTA*2H <sub>2</sub> O	5mM	1,86g
KCl	12mM	0,895g
mit H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub> ad 1000ml		

Lösung mit HCl auf pH 7,8 einstellen und anschließend autoklavieren.

VSP + 15% (w/v) Saccharose

Saccharose	15% (w/v)	30g
		mit VSP ad 200ml

Lösung immer frisch ansetzen und anschließend sterilfiltrieren, bei 4°C 2-3 Tage haltbar.

Benötigtes Material:

- Medium: MEM + 10% FCS
- Sterile Metallsiebe
- *Dounce*-Homogenisatoren
- Polyallomerröhrchen

Zur Produktion von gereinigtem mCMV benötigt man 40 bis 50 Petrischalen (Ø 14,5cm) mit fast konfluent bewachsenen MEF der zweiten oder dritten Passage. Diese wurden mit  $1 \times 10^5$  PFU mCMV pro Petrischale infiziert. Nach dem Absaugen des Mediums aus den Schalen wurde das Virus in einem Volumen von 5ml pro Petrischale auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden dann für 30min bei RT unter mehrmaligem Schwenken mit dem Virus inkubiert. Anschließend wurden 20ml frisches Medium pro Schale pipettiert. Die infizierten MEF wurden für 4 bis 5 Tage inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt waren die Zellen stark infiziert, d.h. die Mehrzahl von ihnen war bereits abgekugelt und befand sich im Überstand. Die noch adhärennten Zellen wurden mit einem sterilen Zellschaber abgelöst und zusammen mit dem Überstand in sterile 500ml Zentrifugenbecher überführt. Anschließend wurden sie bei 6370xg und 4°C für 20 min zentrifugiert (Sorvall RC 5C Plus, Rotor SLA-3000). Ab diesem Zeitraum erfolgten alle Arbeitsschritte bei 4°C bzw. auf Eis.

Die Überstände des vorhergehenden Zentrifugationsschrittes wurden in sterilen 250ml Zentrifugenbechern gesammelt. Danach wurden die Pellets in 10ml kaltem Medium resuspendiert und homogenisiert, wobei der Stempel des *Dounce* Homogenisators mindestens 25 Mal auf und ab bewegt werden musste, um eine ausreichende Homogenisierung zu erreichen. Das Homogenat wurde in sterile 250ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 20min bei 3670xg und 4°C (Sorvall RC 5C Plus, Rotor SLA-1500) zentrifugiert. Das Pellet, welches überwiegend aus Zelltrümmern besteht, wurde verworfen. Der gewonnene Überstand wurde mit den vorher gesammelten Überständen vereinigt. Danach wurde für 3h bei 28000xg und 4°C (Sorvall EC 5 C Plus, Rotor SLA-1500) zentrifugiert, anschließend der Überstand dekantiert und die Pellets zum Lösen ün auf Eis (im Kühlraum) gestellt.

Am nächsten Tag wurden die Pellets im verbliebenen Medium resuspendiert und auf Eis noch einmal homogenisiert. Dazu wurde wieder ein *Dounce* Homogenisator benutzt und der Stempel auch diesmal mindestens 25 Mal auf und ab bewegt. Danach wurde das Homogenat (5ml) geteilt und vorsichtig auf jeweils ein kaltes 15%iges (w/v) Saccharose/VSP Kissen in 30ml Polyallomerröhrchen gegeben. (22,5ml Saccharose/VSP und 2,5ml Virussuspension entspricht einem Verhältnis Puffer zu Viruslösung von 10:1). Dann wurde für eine Stunde bei 52800xg und 4°C zentrifugiert (Ultrazentrifuge Sorvall Combi Plus, Rotor AH-629). Der Überstand wurde dekantiert und verworfen, das Pellet mit 2-4ml Saccharose/VSP Puffer überschichtet und zum Lösen für 2 bis 4h oder über Nacht auf Eis gestellt. Das Viruspellet wurde dann mit einer Pasteurpipette vorsichtig resuspendiert, nochmals homogenisiert, und in Aliquots á 20 bis 100µl bei -70°C weggefroren.

Gereinigtes Virus kann bis zu dreimal aufgetaut werden ohne dass der Virustiter signifikant abnimmt. Virusverdünnungen sollten dagegen nicht wieder eingefroren werden.

## 2.8.2 mCMV Titerbestimmung

### Benötigtes Material:

- Methylcellulosemedium (siehe 2.6.1)
- MEM + 10% FCS

Zur Virustiterbestimmung wurden MEF der 2. oder 3. Passage in 48-well Kulturplatten angelegt. Zur Verdünnung des Virusstocks wurden in sterilen Eppendorf Reaktionsgefäßen jeweils 450µl Medium vorgelegt und 50µl des Virusstocks über 6 bis 8 Verdünnungsstufen  $\log_{10}$  titriert. Die gesamte Virustitration erfolgte auf Eis mit gekühltem Medium und regelmäßigem Wechsel der Piptenspitze.

Von jeder Verdünnungsstufe wurden 100µl in ein well mit konfluenten MEF pipettiert – jeweils als Duplikat bzw. Triplikat – aus dem davor das Medium abgesaugt worden war. Anschließend wurden die Zellen zur Infektion 1h bei 37°C inkubiert, die wells mit 500µl Methylcellulosemedium überschichtet und nach 4 Tagen der Virustiter bestimmt:

$$\text{Virustiter (PFU/ml)} = \text{Plaquezahl} \times V \times 10 \quad (V: \text{Verdünnungsfaktor})$$

Duplikate bzw. Triplikate wurden bei der Berechnung gemittelt. Die errechneten Werte ergaben dann den Virustiter pro ml (Reddehase et al., 1985).

## 2.8.3 Zentrifugale Infektion von MEF

Für zentrifugale Infektionen wurden MEF der 2. oder 3. Passage in 6-well oder 24-well Kulturplatten angelegt. Die Platten wurden vor Infektion einmal mit PBS gewaschen und anschließend nach Zugabe von Viruslösung in Medium oder Kulturüberstand für 5min bei 760xg (Multifuge 3 S-R) zentrifugiert. Danach wurden die Platten um 180° gedreht und noch einmal für 25min bei 760xg zentrifugiert. Die Platten wurden anschließend entweder mit Medium supplementiert oder mit Methylcellulose (siehe 2.6.1) überschichtet.

## 2.9 Molekularbiologische Methoden

### 2.9.1 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden entweder von den Firmen MWG-Biotech AG (Ebersberg) oder Operon Biotechnologies (Köln) bezogen. Die Positionsangaben für mCMV-Sequenzen erfolgten nach Rawlinson et al., 1996 (*GenBank Accession No.*: NC\_004065), bei allen

anderen Sequenzen ist die jeweilige *GenBank* Nummer angegeben (Altschul et al., 1990). Durch PCR eingebaute Restriktionsschnittstellen sind hervorgehoben. Die Amplifikatgrößen beziehen sich, wenn nicht anders vermerkt, auf Amplifikationen aus DNA *template*. Gelöst wurden die Primer in sterilem *Aqua bidest*, die Sonden in sterilem Tris Puffer pH 8,0. Es wurden nachfolgend alle in der quantitativen PCR getesteten Primer und Sonden aufgeführt, wobei die optimalen Primerkombinationen, welche nach Etablierung ausschließlich in die Quantifizierungen eingesetzt wurden, mit einem \* gekennzeichnet sind.

### 2.9.1.1 Oligonukleotide für Klonierungen

#### PCR vermittelte Klonierung von *pDrive\_IE3\_PTHrP\_Tdy*

IE3-Gene\_For1\_Sac n'177983-178003; 5'-AAA **AGA GCT** ▼CCT CGC AGT CAG ACT CAT  
ACT C-3'

IE3-Gene\_Rev1\_Sac n'179515-179494; 5'-AAA **AGA GCT** ▼CCC CGA GAT GAA CAT AGA  
TAT TG-3'

Amplifikatgröße: 1553bp

PTHrP-7 5'-GCT GTG TCT GAA CAT CAG CT-3'

*GenBank Accession No.:* M60056; n'126-145

rcPTHrP-8 5'-CTT TGT ACG TCT CCA CCT TG-3'

*GenBank Accession No.:* M60056; n'363-344

Amplifikatgröße: 238bp

TdyGene\_for1\_Apa 5'-AAA **AGG GCC** ▼CTG GGA CTG GTG ACA ATT GTC-3'

*GenBank Accession No.:* 287804; n'70-89

TdyGene\_rev1\_Apa 5'-AAA **AGG GCC** ▼CAG TAC AGG TGT GCA GCT CTA C-3'

*GenBank Accession No.:* 287804; n'470-450

Amplifikatgröße: 421bp

#### PCR vermittelte Klonierung von *pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy* (Simon et al., 2005)

gB-B-for n'85726-85705; 5'-TGT ACA AGT GAG GTA ATC GCG G-3'

gB-B-rev n'82910-82933; 5'-TAT TAT TAT CCT CGC AGC GTC TCC-3'

Amplifikatgröße: 2817bp

Apal-PTHrP-7neu 5'-TAT **AGG GCC** ▼CGC TGT GTC TGA ACA TCA GCT-3'

*GenBank Accession No.:* M60056; n'126-145

Xbal-rcPTHrP-8neu 5'-TTA **AT**▼**C TAG** ACT TTG TAC GTC TCC ACC TTG-3'

*GenBank Accession No.:* M60056; n'363-344

Amplifikatgröße: 258bp

RT-PCR vermittelte Klonierung von *pDrive\_Early-1*

E1_Intron1_For1	n'163878-163889 (Exon 1) und n'163983-163992 (Exon 2) 5'-TCG AAG AGG AAT GTT CTC CAC G-3'
E1_Intron2_Rev1	n'164496-164486 (Exon 3) und n'164159-164151 (Exon 2) 5'-TTG TTG TCC TCC ATC GCT GA-3' Amplifikatgröße: RNA: 200bp
Early1_For1	n'163137-163158; 5'-GAC GAC GTT ACT TCA CCT TCC G-3'
Early1_Rev1	n'165064-165043; 5'-GAA CAC ATT GTC CAA GTC GAC C-3' Amplifikatgröße: DNA: 1928bp; RNA: 1509bp

**2.9.1.2 Oligonukleotide für SYBR-Green Quantifizierungen**

LCgB_For1	n'83664-83684; 5'-ATG ATC TCG TCC AGG CTG AAC-3'
LCgB_Rev1	n'83818-83798; 5'-TTC AGG AAC GTG ACC AGT TTG-3' Amplifikatgröße: 155bp
LCgB_For2	n'83790-83810; 5'-ATG TGT TCC AAA CTG GTC ACG-3'
LCgB_Rev2	n'83915-83895; 5'-GAT TAT GCT GGG AAC CTT TCG-3' Amplifikatgröße: 126bp
LCgB_For3*	n'84017-84037; 5'-GAA GAT CCG CAT GTC CTT CAG-3'
LCgB_Rev3*	n'84151-84131; 5'-AAT CCG TCC AAC ATC TTG TCG-3' Amplifikatgröße: 115bp
LCIE3_For1*	n'178482-178462; 5'-CCG TGC ATG ACA AGT TCA TCA-.3'
LCIE3_Rev1*	n'178348-178368; 5'-TGG TGT GCT CTG TCA TGA AGG-3' Amplifikatgröße: 135bp
LCPTHrP_For1	5'-CCA CCT TGT TGG TTT CCT GAG-3' <i>GenBank Accession No.:</i> M60056; n'351-331
LCPTHrP_Rev1	5'-ACA GCC GAA ATC AGA GCT ACC-3' <i>GenBank Accession No.:</i> M60056; n'222-242 Amplifikatgröße: 130bp
LCPTHrP_For2*	5'-GGT ATC TGC CCT CAT CGT CTG-3' <i>GenBank Accession No.:</i> M60056; n'327-307
LCPTHrP_Rev2*	5'-CGT TTC TTC CTC CAC CAT CTG-3' <i>GenBank Accession No.:</i> M60056; n'186-206 Amplifikatgröße: 142bp
LCPTHrP_For3	5'-TCC GAG GTA GCT CTG ATT TCG-3' <i>GenBank Accession No.:</i> M60056; n'247-227

LCPThrP_Rev3	5'-ACT GCA TGA CAA GGG CAA GTC-3' <i>GenBank Accession No.:</i> M60056; n'146-166 Amplifikatgröße: 102bp
LCTdy_For1*	5'-ATG CAT TTA TGG TGT GGT CCC-3' <i>GenBank Accession No.:</i> 287804; n'126-146
LCTdy_Rev1*	5'-AAG GGC CTT TTT TCG GCT TC-3' <i>GenBank Accession No.:</i> 287804; n'258-239 Amplifikatgröße: 133bp
LCTdy_For2	5'-ACA GAA GCC GAA AAA AGG CC-3' <i>GenBank Accession No.:</i> 287804; n'236-255
LCTdy_Rev2	5'-CAG GCT GTA AAA TGC CAC TCC-3' <i>GenBank Accession No.:</i> 287804; n'371-351 Amplifikatgröße: 136bp

### 2.9.1.3 Oligonukleotide für TaqMan Quantifizierungen

E1_Taq_For1	n'164113-164139; 5'-CTT TTT GAA CAG TTA TGC TGC TAG TTC-3'
E1_Taq_Rev1	n'164523-164501; 5'-GAA TTA AAG ACG CCT TCA AAA CG-3' Amplifikatgröße: DNA: 411bp; RNA: 85bp
E1_Taq_For2	n'164068-164091; 5'-CAG TAC CAC TGT CGA TGG TAA TGC-3'
E1_Taq_Rev2	n'164523-164501; 5'-GAA TTA AAG ACG CCT TCA AAA CG-3' Amplifikatgröße: DNA: 456bp; RNA: 130bp
gB_Taq_For1*	n'83137-83156; 5'-CTA GCT GTT TTA ACG CGC GG-3'
gB_Taq_Rev1*	n'83227-83207; 5'-GGT AAG GCG TGG ACT AGC GAT-3' Amplifikatgröße: DNA: 91bp; RNA: 91bp
gB_Taq_For2	n'83081-83099; 5'-GCC CGT CGG CAG TCT AGT C -3'
gB_Taq_Rev2	n'83161-83141; 5'-ATA CTC CGC GCG TTA AAA CAG-3' Amplifikatgröße: 81bp
IE1_Taq_For1*	n'181184-181210; 5'-TGG CTG ATT GAT AGT TCT GTT TTA TCA-3'
IE1_Taq_Rev1*	n'181438-181421; 5'-CTC ATG GAC CGC ATC GCT-3' Amplifikatgröße: DNA: 255bp; RNA: 133bp
IE3_Taq_For2*	n'181463-181441; 5'-TGA TCC CAC TGA GGA AGA GAA GA-3'
IE3_Taq_Rev2*	n'179478-179497; 5'-GAG GCC GCT GCT GTA ACA AT-3' Amplifikatgröße: DNA: 1986bp; RNA: 132bp
PTHrP_Taq_For1*	5'-CAA GGG CAA GTC CAT CCA AG-3' <i>GenBank Accession No.:</i> M60056; n'155-174

PTHrP_Taq_Rev1*	5'-GGG ACA CCT CCG AGG TAG CT-3' <i>GenBank Accession No.:</i> M60056; n'255-236 Amplifikatgröße: 101bp
PTHrP_Taq_For2	5'-GAT TTC GGC TGT GTG GAT CTC-3' <i>GenBank Accession No.:</i> M60056; n'233-213
PTHrP_Taq_Rev2	5'-ACT GCA TGA CAA GGG CAA GTC-3' <i>GenBank Accession No.:</i> M60056; n'146-166 Amplifikatgröße: 88bp
Tdy_Taq_For1*	5'-AAG CGC CCC ATG AAT GC-3' <i>GenBank Accession No.:</i> 287804; n'113-129
Tdy_Taq_Rev1*	5'-CCC AGC TGC TTG CTG ATC TC-3' <i>GenBank Accession No.:</i> 287804; n'216-197 Amplifikatgröße: 104bp

#### 2.9.1.4 Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide (TaqMan Sonden) für quantitative PCR und quantitative RT-PCR

Early1_Taq_P1	n'164490-164486 (Exon 3), n'164159-164145 (Exon 2) 5'-[6~FAM]TCC TCC ATC GCT GAC GGC GG[TAMRA~6~FAM]-3'
Early1_Taq_P2*	n'164004-164025 5'-[6~FAM]AGC CCA AGC GCC AGA AGA CCC A[TAMRA~6~FAM]-3'
Early1_P2_Cy5*	n'164004-164025 5'-[Cy5]AGC CCA AGC GCC AGA AGA CCC A[BHQ3a~Cy5]-3'
gB_Taq_P1*	n'83175-83200 5'-[6~FAM]TGC TCG GTG TAG GTC CTC TCC AAG CC [TAMRA~6~FAM]-3'
gB_Taq_P2	n'83132-83111 5'-[6~FAM]CAG CCA ACG CAC CGA GAA AGC G[TAMRA~6~FAM]-3'
IE1_Taq_P1*	n'181239-181249 (Exon 4), n'181372-181385 (Exon 3) 5'-[6~FAM]AAC GCT CCT CAC TGC AGC ATG CTT G [TAMRA~6~FAM]-3'
IE1_Taq_P1_Hex*	n'181239-181249 (Exon 4), n'181372-181385 (Exon 3) 5'-[5HEX]AAC GCT CCT CAC TGC AGC ATG CTT G[BHQ1a~5HEX]-3'
IE1_Taq_Joe1*	n'181239-181249 (Exon 4), n'181372-181385 (Exon 3) 5'-[Joe]AAC GCT CCT CAC TGC AGC ATG CTT G[BHQ1]-3'
IE3_Taq_P1*	n'179499-179517 (Exon 5), n'181372-181379 (Exon 3) 5'-[6~FAM]TCT ATG TTC ATC TCG GGT CCT GCA GCA[BHQ1a~6FAM]-3'
PTHrP_Taq_P1*	<i>GenBank Accession No.:</i> M60056; n'177-197



PTHrP_Taq_P2	5'-[6~FAM]TTG CGC CGC CGT TTC TTC CTC[TAMRA~6~FAM]-3' GenBank Accession No.: M60056; n'170-191
Tdy_Taq_P1*	5'-[6~FAM]CCA AGA CTT GCG CCG CCG TTT C[TAMRA~6~FAM]-3' GenBank Accession No.: 287804; n'162-184
	5'-[6~FAM]AGT TGG CCC AGC AGA ATC CCA GC[TAMRA~6~FAM]-3'

## 2.9.2 Bakterienstämme

Die meisten Arbeiten wurden mit elektrokompetenten DH10B durchgeführt. Sowohl DH10B als auch DH5 $\alpha$  Bakterienstämme sind zur blau-weiß Selektion befähigt.

<b>DH5<math>\alpha</math>:</b> (Invitrogen)	Genotyp:	F <sup>-</sup> 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) gal <sup>-</sup> phoA supE44 $\lambda$ <sup>-</sup> thi <sup>-</sup> 1 gyrA96 relA1
<b>DH10B:</b> (Invitrogen)	Genotyp:	F <sup>-</sup> mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 recA1 endA1 araD139 $\Delta$ (ara, leu)7697 galU galK $\lambda$ <sup>-</sup> rpsL nupG

## 2.9.3 Vektorsysteme

Für Klonierungen wurde der pDrive Cloning Vector (QIAGEN) verwendet. Der Vektor hat eine Größe von 3581bp, erlaubt Ampicillin und Kanamycin Selektion und besitzt eine  $\alpha$ -Komplementation zur blau-weiß Selektion nach Transformation.

Zur Herstellung von *in vitro* Transkripten wurden entweder der pDrive Cloning Vector oder der pSP64 Poly(A) Vector (Promega) verwendet. Letzterer hat eine Größe von 3030 bp, eine Ampicillin Resistenz und einen an die MCS anschließenden 30bp langen Poly dA:dT Rest.

## 2.10 Molekularbiologische Standardmethoden DNA

### 2.10.1 Isolierung von DNA aus Zellen, Geweben und Virusstocks

#### 2.10.1.1 Aufarbeitung der Leber zur anschließenden phenolischen DNA Extraktion

##### Lysepuffer

NaCl	100mM	5,844g
Tris	10mM	1,21g

EDTA*2H <sub>2</sub> O	25mM	9,306g
SDS	0,5%	5g

Lösung auf pH 8,0 einstellen und ad 1l mit H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> auffüllen.

#### RNase

Stock: 500µg/ml, Endkonzentration: 20µg/ml

#### Proteinase K

Stock: 20mg/ml, Endkonzentration: 100µg/ml

Um eine optimale Lyse des Lebergewebes zu gewährleisten wurden die Organe zuerst mit Hilfe der Labor-Schwingmühle MM300 (Mixer-Mill) von QIAGEN/Retsch (Hilden) homogenisiert. Dazu wurden in ein 2ml Gefäß 1 bis 2 Nirostahl Kugeln (Ø 3 oder 4mm) und 200 bis 300mg Gewebe gegeben. Dieser Ansatz wurde bei 30 Hertz für 5min zerkleinert. Im Falle, dass große Organen homogenisiert werden sollten, wurden diese Gewebe auf 2 bis 4 Gefäße verteilt. Aus den Homogenaten wurden 50 bis 75mg entnommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 500µl Lysepuffer und 20µl RNase inkubierte das Homogenat für 3h bei 37°C auf einem Schüttler. Auf diese Weise war es möglich, das komplette Organ sukzessiv aufzuarbeiten. Nach 3h Inkubation wurde 2,5µl Proteinase K dazugegeben und der Ansatz über Nacht bei 55°C unter Schütteln inkubiert. Die anschließende Phenol Extraktion ist unter 2.10.1.5 beschrieben.

### 2.10.1.2 DNA Isolierung aus Organen, Zellen und Geweben

Standardmäßig wurde zur Gewinnung von DNA aus Zellen der DNeasy Tissue Kit (QIAGEN, Hilden) verwendet. Dieser Kit ermöglicht eine schnelle und saubere Isolierung von DNA aus Zellen und Geweben. Das Gewebe wurde lysiert und die DNA reversibel an eine Silica-Gel Matrix gebunden. Die DNA durch Waschen gereinigt und anschließend eluiert.

Eingesetzte Gewebe oder Organe wurden, wie unter 2.10.1.1 beschrieben, in der Schwingmühle homogenisiert und Aliquots des Homogenats zur DNA Isolierung eingesetzt. Es war darauf zu achten, dass die für die Säule maximal einzusetzende Menge nicht überschritten wurde, da dies zur deren Überladung und so zu Verlusten in der DNA Ausbeute führt.

Organ	Maximal eingesetzte Menge	Frequenz [Hz]	Zeit [min]	Kugel Ø und Anzahl	Maximales Elutionsvolumen [µl]
Leber	25mg	30	5	1×3mm	200
Milz	10mg	30	5	1×3mm	200
Lunge	25mg	30	5	1×3mm	200
Mausschwanz	0,6-1,2cm	30	15	2x3-4mm	200
Zellen	5x10 <sup>6</sup>	-	-	-	200

Die in der Tabelle definierte Menge an Gewebekomogenat wurde in 180µl Lysepuffer und 20µl Proteinase K aufgenommen und über Nacht bei 55°C unter Schütteln lysiert. Am

nächsten Tag wurde der Ansatz gevortext, mit 200µl Bindepuffer versetzt und für 10min auf 70°C inkubiert. Wenn DNA aus Zellkulturen aufgearbeitet wurde, entfiel die Lyse über Nacht, die Zellen wurden direkt in 200µl Bindepuffer und 20µl Proteinase K aufgenommen und bei 70°C lysiert. Der Bindepuffer enthält ein chaotropes Salz, wodurch der DNA die Hydrathülle entzogen wird. Nach der Inkubation wurde der Ansatz mit 200µl Ethanol (96-100%) versetzt, auf eine DNeasy Säule überführt und die DNA durch Zentrifugation (6000xg, 1min) an das Säulenmaterial gebunden. Die gebundene DNA wurde mit verschiedenen im Kit enthaltenen Puffern gewaschen und die Säule anschließend trocken zentrifugiert. Dadurch wurden Ethanolverschleppungen vermieden. Am Ende wurde die DNA in einer definierten Menge an Puffer (siehe Tabelle) eluiert. Falls geringere Mengen an Ausgangsmaterial eingesetzt wurden, konnte die Elutionsmenge auf bis zu 50µl reduziert werden.

Versuchsprotokoll siehe:

<http://www1.qiagen.com/literature/protocols/DNeasyBloodTissue.aspx>

### 2.10.1.3 DNA Isolierung aus Blut

Entnommenes Blut (siehe 2.4.4) wurde mit Protease und einem salzhaltigen Puffer versetzt und für 10min bei 56°C inkubiert. Nach Zugabe von Ethanol wurde der Ansatz auf eine QIAamp Spin Säule (QIAGEN) gegeben, zentrifugiert und zweimal gewaschen. Im Anschluss daran erfolgte die Elution der DNA mit 50 bis 200µl Puffer.

Versuchsprotokoll siehe:

<http://www1.qiagen.com/products/genomicdnastabilizationpurification/qiaampsystem/qiaampdnabloodminikit.aspx>

### 2.10.1.4 DNA Isolierung aus Virusstocks

Um virale DNA aus Virionpartikeln zu gewinnen, wurde der *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* (Roche, Mannheim) verwendet. Nach der Virus Lyse in Gegenwart von Proteinase K erfolgte die reversible Bindung der DNA an eine Glasfibrermembran. Nach Reinigung der Nukleinsäuren von Salzen, Proteinen und anderen Kontaminanten durch verschiedene Waschschrte konnte die gereinigte DNA von der Membran eluiert werden. Die gereinigte DNA diente zur Herstellung von Plasmid-Standards, die zur Quantifizierung in der *real-time* PCR eingesetzt wurden.

Versuchsprotokoll siehe:

[http://www.roche-applied-science.com/PROD\\_INF/MANUALS/napi\\_man/pdf/chapter2/page\\_69-73.pdf](http://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/MANUALS/napi_man/pdf/chapter2/page_69-73.pdf)

### 2.10.1.5 Phenolische DNA Extraktion

<u>Roti-Phenol</u>	(v/v)	Phenol	in TE Puffer pH 7,5-8,0 gesättigt
<u>Roti-Phenol/Chloroform</u>	(v/v)	Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol (25:24:1)	in TE Puffer pH 7,5-8,0 gesättigt

Chloroform (v/v) Chloroform, Isoamylalkohol,  
24:1

Die Phenol/Chloroform Extraktion dient zum Abtrennen von Proteinen aus nukleinsäurehaltigen Lösungen, z.B. bei Präparation von Plasmid-DNA oder zur DNA Aufreinigung aus Geweben. Durch die organischen Lösungsmittel Phenol und Chloroform werden die Proteine denaturiert, die sich dann in der Interphase sammeln und präzipitiert werden können. Die zu extrahierende Probe wurde zuerst mit dem gleichen Volumen an Phenol, danach mit je einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und zum Schluss mit Chloroform/ Isoamylalkohol versetzt. Zwischen den 3 Schritten wurde für jeweils 2min gevortext, bzw. vorsichtig geschüttelt. Die entstandene Emulsion wurde zur Phasentrennung für 5min bei maximaler Drehzahl zentrifugiert und die obere wässrige Phase, in der sich die DNA befand, weitergeführt.

Wenn DNA aus Geweben isoliert wurde um anschließend *real-time* Quantifizierungen durchzuführen, wurde nach der Isolierung noch eine Aufreinigung mit dem *High Pure PCR Template Preparation Kit* durchgeführt. Dabei binden Nukleinsäuren bei Anwesenheit von chaotropen Salzen spezifisch an der Oberfläche von Glasfasern und können so gewaschen und eluiert werden.

Versuchsprotokoll siehe:

[https://www.roche-applied-science.com/PROD\\_INF/MANUALS/napi\\_man/napi.htm](https://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/MANUALS/napi_man/napi.htm)

## 2.10.2 Präzipitation von Nukleinsäuren

### Natriumacetat

NaAc*3H <sub>2</sub> O	3M	136,08g/mol	40,824g
------------------------	----	-------------	---------

mit H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> ad 100ml

Lösung mit Eisessig auf pH 5,2 einstellen und autoklavieren.

### TE Puffer

Tris	10mM	121,1g/mol	1,211g
EDTA*2H <sub>2</sub> O	1mM	372,24g/mol	0,372g

mit H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> ad 1l

Lösung mit HCl auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren.

### Tris Puffer

Tris	10mM	121,1g/mol	1,211g
------	------	------------	--------

mit H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> ad 1l

Lösung mit HCl auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren.

Nukleinsäuren können aus wässrigen Lösungen durch Zugabe von monovalenten Kationen und Alkohol ausgefällt werden (Eickbush & Moudrianakis, 1978). Als Fällungsreagenzien wurden dabei 1/10 Volumen 3M Natriumacetat pH 5,2 und die 2,5fache Menge 100%iges Ethanol verwendet. Die Temperatur der Fällung und die Fälldauer wurden dabei der jeweiligen Probenmenge angepasst. Je niedriger die Temperatur ist, desto effizienter fallen

die Nukleinsäuren aus. Eine zu kurze Präzipitationsdauer ist vor allem bei geringen DNA Mengen kritisch.

In der Regel wurde die Proben der Nukleinsäuren mit Natriumacetat und  $-20^{\circ}\text{C}$  kaltem Ethanol gemischt und 3 bis 4 Stunden bei  $-70^{\circ}\text{C}$  oder über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefällt. Nach dem Fällen wurde die Probe bei maximaler Geschwindigkeit für 30min bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Präzipitat mit dem gleichen Volumen an ebenfalls gekühltem 70%igen Ethanol gewaschen, um eventuell vorhandenes Salz zu entfernen. Die Probe wurde noch einmal für 10min bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes mit einer Pipette wurde das Pellet für 15min bei RT getrocknet. Das Lösen des Pellets erfolgte in einem geeigneten Volumen TE oder Tris Puffer. Bei geringen Nukleinsäurekonzentrationen war sehr häufig das Pellet nicht sichtbar, weshalb vor allem beim Absaugen des Überstandes und beim Lösen der DNA zuvor genau auf die Lage des Reaktionsgefäßes in der Zentrifuge geachtet werden musste.

### 2.10.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Standardmäßig wurde die Konzentration für DNA und RNA Proben spektrometrisch mit Hilfe eines Photometers bei 260nm bestimmt. Proben wurden entweder im BioPhotometer (Eppendorf) oder mit dem Nanodrop (PEQLAB) bestimmt. Beim BioPhotometer wurde eine minimale Menge von  $50\mu\text{l}$  zur Bestimmung in die Küvette eingesetzt. Die Proben wurden bei sehr hohen Konzentrationen verdünnt. Zur Verdünnung sind TE Puffer oder 10mM Tris (pH 8,0) gepuffertem Wasser vorzuziehen, weil das Absorptionsverhalten von Nukleinsäuren in nichtgepufferten Lösungen stark variieren kann (Wilfinger et al., 1997). Den Konzentrationsberechnungen wurden folgende Werte zugrunde gelegt:

Extinktion <sub>260nm</sub> = 1	⇒	50 $\mu\text{g/ml}$	bei doppelsträngiger DNA
	⇒	40 $\mu\text{g/ml}$	bei einzelsträngiger RNA
	⇒	33 $\mu\text{g/ml}$	bei einzelsträngiger DNA

Proteine können die Proben verunreinigen. Aus diesem Grund wurde die Reinheit der Nucleinsäurelösung bestimmt, indem zusätzlich zur Extinktion bei 260nm noch die Extinktion bei 280nm, bei der die Proteine ihr Extinktionsmaximum haben, gemessen wurde. Aus den beiden Extinktionen wurde der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  bestimmt, der ein Maß für die Reinheit einer Nukleinsäureprobe darstellt. Proteinfreie DNA Lösungen weisen ein Verhältnis von 1,8 bis 2,0 auf, für RNA sollte der Quotient über 2,0 liegen (Sambrook and Russel, 2001).

### 2.10.4 Spaltung von Nukleinsäuren mit Restriktionsenzymen

Restriktionen für analytische Zwecke wurden zumeist mit 0,2 bis 1,5 $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA in 10 bis 20 $\mu\text{l}$  Ansätzen durchgeführt. Standardmäßig wurden für diesen Zweck Enzymmengen von 5 bis 20U pro Ansatz in einem für die Aktivität des Enzyms geeignetem Puffer eingesetzt. Die Restriktionsansätze wurden bei enzyspezifischer Temperatur von 6 Stunden bis über Nacht inkubiert. Dabei war es möglich, sofern die Pufferbedingungen übereinstimmten, verschiedene Restriktionen in einem Ansatz durchzuführen.

Präparative DNA Restriktionen bei denen größere Mengen an DNA verdaut wurden (5-20µg in 20-100µl) erfolgten immer über Nacht.

#### Standard-Restriktionsansatz

10x Reaktionspuffer	2µl
Plasmid-DNA	xµg
Restriktionsenzym(e)	yµl
<i>Aqua bidest</i>	ad 20µl

Nach der Restriktion erfolgte immer eine Aufreinigung der DNA entweder über ein präparatives Gel (2.10.5) und Gelelution (2.10.6) oder über Säulenaufreinigung (2.10.7).

## 2.10.5 Agarose Gelelektrophorese von DNA

#### 50xTAE Puffer

Tris	2M	121,1g/mol	1211g
EDTA*2H <sub>2</sub> O	50mM	372,24g/mol	93,06g
		Mit H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 5l

Lösung mit Eisessig auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren.

Gebrauchslösung: 1xTAE

#### 10x Probenpuffer

Bromphenolblau	0,25% (w/v)
Saccharose	40% (w/v)

DNA Fragmente können in Agarosegelen nach ihren Molekulargewichten elektrophoretisch aufgetrennt werden. Mit Hilfe der Gelelektrophorese wurden Größenabschätzungen von DNA Fragmenten, Konzentrationsbestimmungen, Reinigung von linearen DNA Fragmenten nach PCR oder Restriktion, Intaktheitsüberprüfungen oder präparative Aufreinigungen von Nukleinsäuren durchgeführt. Standardmäßig wurden 1%ige Gele verwendet. Für größere bzw. kleinere Fragmente wurde die Konzentration der Agarose zwischen 0,6% bzw. 2% variiert. Je nach Anzahl der Proben und Größe der Fragmente wurden Maxigele (20 x 20cm, bzw. 20 x 10cm) oder Minigele (10 x 6,5cm) verwendet. Die entsprechende Agarosemenge wurde durch Aufkochen in 1xTAE Puffer gelöst und nach Abkühlen auf ca. 50°C in einen Elektrophoreseschlitten mit Kamm gegossen. Als Laufpuffer diente 1xTAE. Die Proben wurden mit 1/10 Volumen Probenpuffer versetzt, der ein Einsinken der Nukleinsäuren in die Geltaschen gewährleistet. Die Auftrennung der Proben erfolgte in horizontalen Elektrophoresekammern. Dabei richtete sich die angelegte Spannung nach der Fragment- bzw. Gelgröße und Nukleinsäuremenge (0,5-5 V/cm Elektrodenabstand).

Um die DNA Banden beurteilen zu können, wurde entweder in den Laufpuffer (Endkonzentration: 100ng/ml) oder in das Gel Ethidiumbromid (Endkonzentration: 1µg/ml) dazugegeben. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA Doppelhelix und fluoresziert unter UV-Licht, so dass die DNA unter einem UV-Schirm sichtbar gemacht werden kann. Die Dokumentation erfolgte entweder mit Hilfe einer Sofortbildkamera oder einer CCD

Videokamera. Zur Größenbestimmung wurde ein entsprechender DNA Größenmarker auf das Gel gegeben und mit aufgetrennt.

### **2.10.6 Elution von DNA aus Agarosegelen**

Die Elution von DNA Fragmenten wurde in erster Linie dazu verwendet, PCR Amplifikate oder Restriktionen aufzureinigen. Je nach Fragmentgröße und Menge der DNA wurden unterschiedliche Kits (QIAGEN, Hilden) benutzt.

#### **2.10.6.1 Geelution mit QIAEX II Kit**

Dieser Kit wurde verwendet, um DNA Mengen, die mehr als 10µg betragen, aufzureinigen. Mit Hilfe dieses Kits ist die Elution von DNA Fragmenten in einem geringen Volumen möglich.

Mit einem Skalpell wurde die gewünschte DNA Bande aus dem Gel ausgeschnitten, gewogen und mit der entsprechenden Menge an Puffer QX1 und den QIAEX II Silica Partikeln versetzt. Die im Puffer QX1 enthaltene hohe Konzentration an chaotropen Salzen zerstörte während der Inkubation bei 50°C die Wasserstoffbindungen der Zucker im Agarosepolymer und löste so das Gelstück auf. Des Weiteren bewirkte die hohe Salzkonzentration eine Dissoziation DNA-bindender Proteine von der DNA und deren Adsorption an die in der Lösung vorhandenen Silica Partikel (Vogelstein et al., 1979). Nachdem das Gelstück vollständig gelöst war, wurde die Probe zentrifugiert und noch zweimal mit verschiedenen Puffern gewaschen. Während der Waschschriffe wurden alle Verunreinigungen wie z.B. Agarose, Proteine, Salze und Ethidiumbromid entfernt. Die anschließende Elution der DNA erfolgte unter Nidrigsalzbindungen. Das Pellet wurde für 15min luftgetrocknet und danach in 20µl TE Puffer resuspendiert. Nach einem abschließenden Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgenommen und entsprechend weiterverwendet.

Versuchsprotokoll siehe:

<http://www1.qiagen.com/products/dnacleanup/qiaexiiextractionsystem/qiaexiiextractionkit.aspx>

#### **2.10.6.2 Geelution mit QIAquick Gel Extraction Kit**

Standardmäßig wurde für DNA Geelutionen der QIAquick Kit (QIAGEN) benutzt. Dieser Kit ermöglicht ebenfalls die Extraktion und Reinigung von DNA Molekülen ohne Phenolextraktion und anschließender Ethanol Präzipitation. Das Prinzip des Kits gleicht dem unter 2.10.6.1 beschriebenen, mit dem Unterschied, dass keine freien Silicapartikel benutzt werden, sondern die gelöste DNA über eine Silicamembran zentrifugiert wird, an die sie - ebenfalls unter Hochsalzbedingungen - adsorbiert. Nach zwei Waschschriffen wird die DNA mit Tris Puffer von der Membran eluiert. Die Elutionsmenge kann, um die DNA Konzentration der Eluats zu erhöhen, auf 30µl reduziert werden, normalerweise wurde aber mit 50µl Tris Puffer eluiert.

Versuchsprotokoll siehe:

<http://www1.qiagen.com/products/dnacleanup/gelpcrsicleanupsystems/qiaquickgelextractionkit.aspx>

### 2.10.7 Reinigung von DNA

Zur schnellen Reinigung von DNA, z. B. nach Restriktionsenzymverdau oder PCRs, wurde der *High Pure PCR Purification Kit* (Roche) verwendet. In Gegenwart von Guanidin Thiocyanat bindet DNA selektiv an spezielle Glasfilter. Die so gebundene DNA wird durch verschiedene Waschstschritte von Oligonukleotiden, Proteinen und Salzen gereinigt, die Elution erfolgte schließlich unter Niedrigsalzbedingungen.

100µl eines PCR Ansatzes oder Restriktionsenzymverdaus, bei geringeren Ausgangsvolumen wurde mit TE Puffer bis 100µl aufgefüllt, wurde mit der fünffachen Menge an Bindepuffer versetzt. Nach vortexen wurde die DNA auf eine Silica Säule gegeben und der Ansatz zentrifugiert. Danach wurde die gebundene DNA noch zweimal gewaschen und abschließend ohne Puffer zentrifugiert, um Verunreinigungen mit Ethanol zu vermeiden. Eluiert wurde mit Tris Puffer, je nach zu erwartender DNA Konzentration in einem Volumen von 50 bis 100µl.

Versuchsprotokoll siehe:

[https://www.roche-applied-science.com/PROD\\_INF/MANUALS/napi\\_man/napi.htm](https://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/MANUALS/napi_man/napi.htm)

### 2.10.8 Dephosphorylierung linearer DNA

Nach einer Restriktion können Vektoren, die mit einem Restriktionsenzym geschnitten wurden, das nur eine Restriktionsschnittstelle im Vektor besitzt, durch die Ausbildung zweier kompatibler Enden wieder miteinander religieren. Bei einer Klonierung würde eine Religation des Vektors allerdings einen hohen Hintergrund ergeben. Um eine Religation zu verhindern, bedient man sich der Dephosphorylierung der terminalem Phosphatgruppen am 5'-Ende des linearisierten Vektors mittels alkalischer Phosphatase. Für die Dephosphorylierung von DNA wurde *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIP; NEB, Frankfurt a.M.) verwendet. Pro µg DNA wurden 0,5U Enzym benötigt. Da CIP in den meisten NEB Puffern aktiv ist, konnte der Restriktionsansatz direkt mit CIP versetzt und bei 37°C für 1h inkubiert werden. Restriktionsansätze mit Puffern und Enzymen anderer Hersteller mussten zuvor gereinigt und konnten erst dann dephosphoryliert werden. Zur vollständigen Entfernung der alkalischen Phosphatase musste der gesamte Ansatz über ein präparatives Agarosegel (2.10.5) gereinigt und die DNA anschließend aus dem Gel eluiert (2.10.6) werden.

### 2.10.9 Ligation von DNA Fragmenten

Mit Hilfe der T4 DNA Ligase kann die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-Hydroxylgruppe einer dsDNA unter ATP Verbrauch katalysiert werden. Für einen Ligationsansatz zwischen 50 und 400ng linearisierter Vektor-DNA und der ein- bis dreifachen molaren Menge an Insert wurden 1 bis 2U (bei kohäsiven



Enden) oder 5U (bei glatten Enden) T4 DNA Ligase und  $\frac{1}{10}$  Volumen 10x Ligationspuffer eingesetzt. Die Ligation fand in einem Gesamtvolumen von 20 $\mu$ l statt. Bei Ligation mit glatten Enden wurde zusätzlich 2 $\mu$ l PEG Lösung zugesetzt. Die Ansätze inkubierten entweder für 2h bei 22°C oder aber ÜN bei 16°C und konnten dann in eine Transformation eingesetzt werden (2.10.12).

### 2.10.10 Ligation von DNA Fragmenten mit PCR Cloning Kit

Dieser Kit ermöglicht ein schnelles und sehr effizientes Klonieren von PCR Produkten, die mit *Taq* und anderen *non-proofreading* Polymerasen generiert wurden. Diese Polymerasen besitzen die Eigenschaft, dass jeweils ein einzelner A-Überhang an die 3'-Enden der PCR Produkte angehängt wird. Diese Überhänge können mit hoher Spezifität mit den 3'-U-Überhängen des pDrive Cloning Vektors hybridisieren. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass durch die U-Überhänge der 3'-Enden des linearisierten Plasmids eine Religation des Vektors verhindert wird und die PCR Produkte ohne das Einfügen von speziellen Restriktionsenzymstellen direkt ligiert werden können.

PCR Produkte wurden nach Gelaufreinigung in folgenden Ligationsansatz eingesetzt:

pDrive Cloning Vektor (50ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
PCR Produkt	1-4 $\mu$ l
2x Ligationsmix	5 $\mu$
<i>Aqua bidest</i>	ad 10 $\mu$ l

PCR Produkte sollten in einem 5 bis 10 molaren Überschuss zum Vektor eingesetzt werden. Dieser Überschuss konnte nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Menge PCR Produkt (ng)} = \frac{\text{Menge Vektor (50ng)} \times \text{Größe PCR Produkt (bp)} \times \text{molares Verhältnis}}{\text{Vektorgröße (3851bp)}}$$

Der Ligationsansatz wurde anschließend für mindestens 2h bei 16°C inkubiert. Nach 10minütiger Hitzeinaktivierung bei 70°C wurden 1 bis 2 $\mu$ l des Ligationsansatzes in elektrokompente Zellen elektroporiert (2.10.12.4).

Versuchsprotokoll siehe:

<http://www1.qiagen.com/products/cloning/pcrcloningsystem/qiagenpcrcloningkit.aspx>

### 2.10.11 Bakterienanzucht

#### 2.10.11.1 Flüssigkulturen

##### LB Medium

NaCl	10g
Bacto Trypton	10g

Hefeextrakt	5g
H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	ad 1l

Mit NaOH auf pH 7 einstellen und autoklavieren.

#### Ampicillin Stammlösung

Ampicillin (Amp)	100mg/ml in <i>Aqua bidest</i>
------------------	--------------------------------

Lösung sterilfiltrieren, aliquotieren und bei -20°C lagern.

Stammlösung 1:1000 verdünnt (Endkonzentration 100µg/ml) einsetzen, Zugabe erst nach Autoklavieren des Mediums.

Zur Herstellung von Flüssigkulturen wurde immer von einer einzelnen Kolonie ausgegangen. Das Picken der Kolonie erfolgte mit einer sterilen Pipettenspitze, die dann in ein mediumgefülltes Kulturröhrchen (5ml LB Medium), überführt wurde. Die Anzucht erfolgte über Nacht bei 37°C unter Schütteln mit 250 U/min. Wenn größere Volumen (> 10ml) an Bakterienkultur benötigt wurden, wurde zuerst eine 5ml Vorkultur angeimpft. Dazu wurde eine einzelne Kolonie gepickt und in 5ml Medium für 5 bis 8 Stunden inkubiert. Ein Aliquot davon ( $1/_{1000}$  Volumen) wurde dann in die Hauptkultur (250ml) überführt. Die Hauptkultur wurde über Nacht bei 37°C inkubiert und geschüttelt.

#### **2.10.11.2 Plattenkulturen**

##### LB Agar

NaCl	10g
Bacto Trypton	10g
Hefeextrakt	5g
Bacto Agar	15g
H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	ad 1l

Mit NaOH auf pH 7 einstellen und autoklavieren.

Plattenkulturen dienen dazu, Bakterien über einen begrenzten Zeitraum (max. 2 Wochen) zu lagern, eine Selektion von Transformanten durchzuführen oder um Flüssigkulturen anzuimpfen.

Der LB Agar wurde durch aufkochen verflüssigt und dann auf 40 bis 45°C abgekühlt. Dem abgekühlten Agar wurden Antibiotikum und gegebenenfalls die X-Gal Lösung für einen  $\alpha$ -Komplementationstest (2.10.12.2 und 2.10.12.4) in entsprechender Konzentration dazugegeben. Der noch flüssige LB Agar wurde in sterile Einweg Plastikschalen gegossen und konnte nach der Polymerisierung für mehrere Wochen im Kühlschrank gelagert werden. Die Plattenkulturen wurden aus Flüssigkulturen durch Ausstreichen mit einer Impföse angelegt. Wenn Transformationsansätze ausplattiert wurden, erfolgt das Verteilen der Bakteriensuspension flächendeckend auf der Agaroberfläche mit einem Drigalski Spatel.

### 2.10.11.3 Dauerkulturen

Um Kulturen lange stabil zu lagern wurden Dauerkulturen angelegt. Dazu wurden 600µl einer frischen LB Kultur in 1,8ml Einfrierröhrchen überführt, mit 400µl Glycerin (40% v/v Endkonzentration) gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

### 2.10.12 Transformation kompetenter Bakterien

#### 2.10.12.1 Kompetenzinduktion mittels CaCl<sub>2</sub>

##### CaCl<sub>2</sub> Lösung

CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	1M	147g/mol	147g
		mit H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	ad 1l

##### MgCl<sub>2</sub> Lösung

MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	1M	203,3g/mol	203,3g
		mit H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	ad 1l

Lösungen autoklavieren und bei 4°C lagern. Die Gebrauchslösungen 0,1M CaCl<sub>2</sub> und 0,1M MgCl<sub>2</sub> wurden vor Gebrauch frisch mit H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> aus den Stammlösungen hergestellt und gekühlt verwendet.

##### Einfrierlösung

0,1M CaCl<sub>2</sub> Lösung, 15% (v/v) Glycerin

Zur Herstellung chemischer kompetenter Bakterien wurde die CaCl<sub>2</sub> Methode zur Kompetenzinduktion verwendet (Cohen et al., 1972).

Von einer Übernachtskultur wurden 20ml Bakteriensuspension entnommen und in 480ml frisches LB Medium überführt. Die Suspension wurde bei 37°C und 250U/min geschüttelt, bis das Bakterienwachstum eine optische Dichte bei 600nm (OD<sub>600</sub>) von 0,8 bis 1 erreicht hatte (3-4h). Danach wurden die Bakterien für 10min bei 5468xg und 4°C abzentrifugiert (Sorvall RC5 Plus, Rotor SLA-1500). Ab hier wurden alle Schritte auf Eis und mit eisgekühlten Medien durchgeführt. Die Bakterienpellets wurden in insgesamt 500ml 0,1M MgCl<sub>2</sub> resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Nach Zentrifugation wurden die Bakterien in insgesamt 500ml 0,1M CaCl<sub>2</sub> aufgenommen und für 30min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie noch einmal für 5min pelletiert und in 50ml Einfrierlösung aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäßen zu je 500µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Mit dieser Methode hergestellte Bakterien können Transformationsraten von 5x10<sup>6</sup> bis 2x10<sup>7</sup> Kolonien pro µg DNA erreichen.

#### 2.10.12.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

LB Medium (2.10.11.1)

LB Platten (2.10.11.2)

Lösung für  $\alpha$ -Komplementationstest (blau/weiß Selektion):

X-Gal Lösung 50mg/ml, gelöst in Dimethylformamid  
Lichtgeschützt bei -20°C lagern  
In LB Agar 1:1000 verdünnt einsetzen (Endkonzentration 100µg/ml)

150µl kompetente Bakterien (2.10.12.1) wurden mit 5 bis 10µl Ligationsansatz (maximal 50ng DNA) gemischt und für 30min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde für genau 2min bei 42°C im Thermoblock hitzebehandelt und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 200µl LB Medium wurde der Ansatz für 45min bei 37°C unter langsamem Schütteln inkubiert und anschließend auf einer LB Agarplatte, in welcher sich Ampicillin und X-Gal Lösung befand, ausgestrichen. Nach dem Ausplattieren wurden die Ansätze im Brutschrank bei 37°C üN inkubiert.

### 2.10.12.3 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Glycerin 10% (v/v), vorgekühlt auf 4°C

Von einer frischen Plattenkultur wurde eine Kolonie gepickt und in 20ml LB Medium üN bei 37°C und 250U/min inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1 Liter LB Medium mit  $\frac{1}{100}$  Volumen der Übernachtskultur versetzt und bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis sich eine OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,7 eingestellt hatte. Die Bakterien wurden auf Eis gekühlt und danach bei 4000xg und 4°C für 15min zentrifugiert (Sorvall RC5 Plus, Rotor SLA 3000). Alle nachfolgenden Schritte wurden nun auf Eis und mit vorgekühlter Glycerinlösung durchgeführt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand komplett entfernt und die Pellets in insgesamt einem Liter 10% (v/v) Glycerin aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation und Abnehmen des Überstandes wurden die Pellets vereinigt und in 500ml 10%igem Glycerin aufgenommen. In einem letzten Waschriff wurde das Pellet in 250ml 10%igem Glycerin aufgenommen und zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde in 3 bis 4ml 10%igem Glycerin aufgenommen, in Aliquots á 50µl in Eppendorf Gefäße überführt und diese sofort in flüssigem Stickstoff weggefroren. Gelagert wurden die Zellen bei -70°C.

### 2.10.12.4 Transformation elektrokompetenter Bakterien

LB Medium und Platten (2.10.11.1 und 2.10.11.2)

X-Gal Lösung (2.10.12.2)

Ein Aliquot elektrokompetenter Bakterien (2.10.12.3) wurde aufgetaut und sofort auf Eis gestellt. Ebenfalls gekühlt wurden die Elektroporationsküvette und der Küvettenhalter. In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 40µl der Bakterien mit 1 bis maximal 2µl des

Ligationsansatzes gemischt und für 1min auf Eis gekühlt. Die Lösung wurde in die vorgekühlte Elektroporationsküvette ( $\varnothing$  0,2cm) überführt und mit 2,5kV, 400 $\Omega$  und 25mF perforiert (Gene Pulser, BIORAD, München). Die Bakterien wurden sofort in 500 $\mu$ l LB Medium aufgenommen und für 30min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Inkubation wurden sie auf einer Agarplatte mit Antibiotikum und Indikatorlösung inkubiert.

## 2.10.13 Plasmid-DNA Präparationen

### 2.10.13.1 Schnellpräparation von Plasmid-DNA

#### Puffer I

Tris	50mM	121,1g/mol	6,06g
Na <sub>2</sub> EDTA*2H <sub>2</sub> O	10mM	372,24g/mol	3,72g
		mit H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	ad 1l

Mit HCl auf pH 8,0 einstellen, autoklavieren und danach 100mg RNase dazugeben.  
Lösung bei 4°C lagern.

#### Puffer II

NaOH	200mM	40,01g/mol	8g
20% (v/v) SDS	1%		5ml
		mit H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	ad 100ml

Lösung autoklavieren und bei RT lagern.

#### Puffer III

KAc	3M	98,12g/mol	294,5g
		mit H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	ad 1l

Mit Eisessig auf pH 5,5 einstellen, autoklavieren und bei 4°C lagern.

Diese Methode diente der schnellen Überprüfung, ob das Klonierungsprodukt von den transformierten Bakterien aufgenommen wurde. Dazu wurden 5ml Bakterienkultur angeimpft und üN bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden 1,5 bis 2ml des Ansatzes in ein Eppendorf Gefäß überführt und bei 6000xg (centrifuge 5417R, Eppendorf) 1min pelletiert. Der Überstand wurde quantitativ abgenommen und das Pellet in 100 $\mu$ l Puffer I resuspendiert. Zur alkalischen Lyse wurden 200 $\mu$ l Puffer II dazugegeben, vorsichtig gemischt und nach 5min Inkubation bei RT die Lösung mit 150 $\mu$ l Puffer III versetzt. Nach vorsichtigem Mischen wurden die Proben für 10min auf Eis gestellt und anschließend bei 20817xg für 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die darin befindliche DNA durch Zugabe von 400 $\mu$ l Isopropanol präzipitiert. Danach wurde der Ansatz bei 20817xg für 20min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand vorsichtig dekantiert und die DNA zweimal mit 250 $\mu$ l eiskaltem 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet für 10min bei RT getrocknet und in 20 bis 50 $\mu$ l TE Puffer pH 8,5 aufgenommen.

Die übrig gebliebene Bakterienkultur wurde ggf. noch dazu verwendet, Dauerkulturen anzulegen oder die in den Bakterien enthaltene DNA über eine Säule aufzureinigen (2.10.13.2).

### 2.10.13.2 QIAprep Spin Miniprep

Das Prinzip des QIAprep Spin Miniprep Kits beruht auf der alkalischen Lyse von transformierten Bakterienzellen (verändert nach Birnboim & Doly, 1979) und anschließender Adsorption der Plasmid-DNA an eine Silica Membran. Unterschiedliche Salzbedingungen während der Adsorption führen zu wechselnden Reaktionsbedingungen, durch die eine Abtrennung der an den Filter gebundenen Plasmid-DNA von anderen zellulären Bestandteilen, wie z.B. genomische DNA, RNA oder Proteine, erfolgt. Es kann dadurch sehr reine Plasmid-DNA gewonnen werden, d.h. diese Methode ist von Bedeutung, wenn die Plasmid-DNA z.B. für Transformationen oder zur Herstellung von Plasmid-DNA Standards einer *real-time* PCR eingesetzt wird, da dort die Reinheit der DNA unerlässlich ist.

Ausgehend von einer 5ml Übernachtskultur wurden 1,5ml der Bakteriensuspension entnommen und bei 6000xg pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 250µl Suspensionspuffer P 1 resuspendiert. Dann wurde Lysepuffer P 2 dazugegeben und das Gefäß vorsichtig 4 bis 6mal invertiert. Nach Zugabe von 350µl Neutralisierungspuffer P3 wurde das Bakterienlysat nach 4-6maligem invertieren für 10min bei 20817xg zentrifugiert, der Überstand abgezogen und auf eine QIAprep Säule gegeben. Anschließend wurde zweimal gewaschen, die Säule durch Zentrifugation von restlichem Waschpuffer befreit und die Plasmid-DNA in 50µl Tris pH 8,5 eluiert.

Versuchsprotokoll siehe:

<http://www1.qiagen.com/products/plasmid/qiagenplasmidpurificationsystem/qiagenplasmidminikit.aspx>

### 2.10.13.3 QIAGEN Plasmid-Maxipräparation

Um größere Plasmidmengen aufzureinigen, wurde eine Plasmidpräparation mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit durchgeführt. Das Protokoll dieser Plasmid-Aufreinigung beruht auf einer modifizierten alkalischen Lyse der Bakterienzellen und einer Bindung der Plasmid-DNA unter geeigneten Niedrigsalz- und pH-Bedingungen an eine Anionenaustauscher Säule. Zelluläre Bestandteile wie RNA, Proteine und andere niedermolekulare Verunreinigungen werden bei mittlerer Salzkonzentration von der Säule gewaschen. Die gereinigte Plasmid-DNA kann mit hoher Salzkonzentration von der Säule eluiert werden und wird zur Entsalzung mit Isopropanol gefällt.

Ausgehend von einer 5ml Vorkultur, die für 6 bis 8 Stunden bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert wurde, wurde die Übernachtskultur angeimpft. Dazu wurde die Vorkultur 1:1000 in 150 bis 200ml (für *high-copy* Plasmide) selektivem LB Medium (2.10.11.1) verdünnt und unter Schütteln bei 37°C für 12 bis 16h inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 6000xg und 4°C für 15min (Sorvall RC5 Plus, Rotor SLA 1500) pelletiert. Die Plasmidpräparation konnte an diesem Schritt unterbrochen werden, indem das Bakterienpellet bei -20°C weggefroren wurde.

Wurde die Präparation weitergeführt, wurde das Bakterienpellet in 10ml Suspensionspuffer P1 gelöst und mit 10ml Lysepuffer P2 versetzt. Die Suspension wurde 4 bis 6mal vorsichtig invertiert und für 5min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 10ml Neutralisierungspuffer P3 wurde die Lösung wieder 4 bis 6mal invertiert und für 20min auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer der Bakterien entfernte man durch Zentrifugation bei 20000xg für 30min bei 4°C. Der Überstand wurde abgenommen, über ein Stück Mull filtriert und noch einmal für 15min bei 20000xg und 4°C zentrifugiert. Während dieser Zeit wurde die Filtersäule mit 10ml Äquilibrierungspuffer QBT äquilibriert und danach der zentrifugierte Überstand auf die Säule gegeben. Zweimal wurde mit Waschpuffer QC gewaschen und die DNA in 15ml Puffer QF eluiert. Anschließend erfolgte die Präzipitation der DNA mit 10,5ml Isopropanol (0,7 Volumen) und einer Zentrifugation für 30min bei 15000xg und 4°C. Das Pellet wurde einmal mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, um noch vorhandene Salzreste zu eliminieren, und dann für 5 bis 10min bei RT getrocknet. Die getrocknete Plasmid-DNA wurde in einem geeigneten Volumen TE Puffer pH 8,0 oder Tris pH 8,5 aufgenommen und anschließend die DNA Konzentration bestimmt (2.10.3).

Versuchsprotokoll siehe:

<http://www1.qiagen.com/products/plasmid/qiagenplasmidpurificationsystem/qiafilterplasmidmaxikit.aspx>

#### 2.10.14 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der PCR wurde von Mullis & Faloona 1987 entwickelt und von Saiki et al. 1988 optimiert. Zur Durchführung der PCR werden sequenzspezifische Primer benötigt, die die beiden Enden des zu amplifizierenden Produkts definieren. Mittels dieser Methode können selektiv bestimmte Sequenzbereiche der DNA millionenfach amplifiziert werden. Unabdingbar ist dabei der Einsatz eines hitzestabilen Enzyms, z.B. der *Taq* Polymerase. Ein PCR Zyklus beginnt mit der thermischen Denaturierung der Ausgangs DNA bei 94 bis 95°C. In einem zweiten Schritt wird die Temperatur abhängig von den jeweiligen Primersequenzen erniedrigt (zwischen 50°C und 68°C), damit beide Primer an die homologen Sequenzen der nunmehr einzelsträngig vorliegenden DNA binden können (*Annealing* Phase). Anschließend findet bei 72°C eine Neusynthese von DNA ausgehend von den Primern durch die thermostabile DNA Polymerase statt (*Extension* Phase). Durch ständige Wiederholung dieser Zyklen wird das gewünschte DNA Fragment (Amplifikat) in großer Menge hergestellt. Da sich die Zahl der neu entstandenen Moleküle mit jedem Zyklus verdoppelt, können theoretisch bei  $n$  Amplifikationen  $2^n$  Moleküle entstehen. Begrenzender Faktor in dieser Reaktion ist, vorausgesetzt Primer und Nukleotide liegen im Überschuss vor, die Aktivitätsdauer der Polymerase.

Die Auswahl der sequenzspezifischen Primer erfolgte mit Hilfe des Programms Primer Express 2.0 (Applied Biosystems). Es musste darauf geachtet werden, dass keine internkomplementären Sequenzen verwendet wurden, welche zu Sekundärstrukturen innerhalb der Oligonukleotide führen können. Um eine ausreichende Sequenzspezifität und bestmögliche Hybridisierungen des DNA:DNA Duplexes zu gewährleisten, wurden Primer mit einer Länge von mindestens 19 Nukleotiden und einem Cytosin oder Guanodin am 3'-Ende ausgewählt.

Standard *Taq* oder HotStar *Taq* PCR Ansatz

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
10× PCR Puffer, 15mM MgCl <sub>2</sub>	5µl	1×, 1,5mM MgCl <sub>2</sub>
dNTP Mix (10mM jedes)	1µl	200µM je dNTP
Primer-for (10pmol/µl)	1,5µl	0,3µM
Primer-rev (10pmol/µl)	1,5µl	0,3µM
<i>Taq</i> / HotStar <i>Taq</i> DNA Polymerase	0,25µl	1,25U
H <sub>2</sub> O	variabel	
DNA	variabel, max. 5µl	≤ 1µg / Reaktion
Endvolumen	50µl	—

Falls die PCR in einem Gerät ohne Deckelheizung durchgeführt wurde, wurde der Ansatz noch mit 50µl Mineralöl überschichtet.

Standard HotStar *Taq* Profil

Initialer Aktivierungsschritt	15min	95°C	Aktivierung der HotStar <i>Taq</i> DNA Polymerase
<b>3-Schritt <i>Cycling</i></b>			
Denaturierung	30-60s	94°C	
Annealing	30-60s	50-68°C	In Abhängigkeit von der Primer Sequenz
Extension	60s/1kbp	72°C	
Zyklenzahl	30-35		
Abschließende Extension	10min	72°C	
Ende	∞	4°C	

Für PCRs mit normaler *Taq* Polymerase wurde statt des initialen Aktivierungsschrittes ein initialer Denaturierungsschritt von 3 Minuten durchgeführt.

**2.10.14.1 PCR für Klonierungszwecke**

Mit Hilfe der PCR ist es möglich, in das Amplifikat Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen einzubringen. Das PCR Produkt kann mit Hilfe dieser Sequenzen mit den geeigneten Enzymen verdaut und in einen Vektor ligiert werden. Bei der Auswahl der Primer musste darauf geachtet werden, dass die Restriktionsschnittstellen nicht am direkten 5'-Ende lagen, sondern *upstream* ein Überhang von 3 bis 4 „nonsense“ Basen vorlag, damit auch am Ende eines DNA Stranges effektiv geschnitten werden konnte (Zimmermann et al., 1998). Um die Fehlerrate während der PCR so gering wie möglich zu halten, wurde die ProofStart DNA Polymerase von QIAGEN verwendet. Hierbei handelt es sich um eine rekombinante DNA Polymerase, die aus einem *Pyrococcus spec.* stammt. Diese Polymerase besitzt keine 5' → 3', sondern eine 3' → 5' Exonuklease Aktivität und ist somit in der Lage, falsch eingebaute Nukleotide vom 3' Ende des wachsenden DNA Stranges zu korrigieren.



Standard ProofStart PCR Ansatz

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
10× PCR Puffer, 15mM MgSO <sub>4</sub>	5µl	1×, 1,5mM MgSO <sub>4</sub>
dNTP Mix (10mM jedes)	1,5µl	300µM je dNTP
Primer-for (10pmol/µl)	5µl	1µM
Primer-rev (10pmol/µl)	5µl	1µM
ProofStart DNA Polymerase	1µl	2,5U
H <sub>2</sub> O	variabel	
DNA	variabel max. 5µl	100ng-1µg genomische DNA 1-50ng Plasmid-DNA
Endvolumen	50µl	—

Standard ProofStart PCR Profil

Initialer Aktivierungsschritt	5min	95°C	Aktivierung der ProofStart DNA Polymerase
3-Schritt Cycling			
Denaturierung	30-60s	94°C	
Annealing	30-60s	50-68°C	In Abhängigkeit von der Primer Sequenz
Extension	60s/1kbp	72°C	
Zyklenzahl	30-40		
Ende	∞	4°C	

**2.10.14.2 Quantitative *real-time* PCR (qPCR)**

Bei einer konventionellen PCR erfolgt die Detektion der Amplifikate am Ende der PCR im Agarosegel. Allerdings lassen sich anhand der Bandenstärke im Gel keinerlei Aussagen über die Ausgangskonzentration der DNA Matrize machen, da ab einer gewissen Anzahl an Zyklen die Amplifikation durch aufgebrauchte Substrate und eingeschränkter Aktivität der Polymerase eine Plateau Phase erreicht und normalerweise nur diese Phase im Gel zu sehen ist. Bei einer PCR kann man grundsätzlich drei Phasen unterscheiden:

1. eine frühe „Hintergrund“ Phase
2. eine exponentielle Wachstumsphase
3. eine Plateau Phase

Im Gegensatz zur Analyse der Plateau Phase bei einer konventionellen PCR kann man in der *real-time* PCR die exponentielle Wachstumsphase verfolgen, in welcher ein Anstieg des Signals direkt mit der eingesetzten Menge an spezifischer Matrize korreliert. Während der exponentiellen Phase kann die Amplifikation durch folgende Formel beschrieben werden:

$$N = N_0 \times (E_{\text{const}})^n$$

E: PCR Effizienz

N: Anzahl der amplifizierten Moleküle

$N_0$ : Initiale Menge an Molekülen  
 n: Anzahl der Zyklen

Die maximal mögliche PCR Effizienz ist 2, also eine Verdopplung (100% Reaktionseffizienz) in jedem Zyklus, wobei das Minimum bei 1, also keiner Amplifikation, liegt. Vergleicht man zwei qPCR Reaktionen mit gleicher PCR Effizienz und definierter Anzahl von Zyklen, ist der Anstieg des Signals während der exponentiellen Phase nur von der Ausgangsmenge des *templates* abhängig.

Signale, die während der qPCR detektiert werden, können auf unterschiedliche Weise generiert werden. Die Detektion kann entweder nicht sequenzspezifisch mit dsDNA bindenden Fluorochromen (z.B. SYBR-Green oder BEBO) oder sequenzspezifisch mit Sonden (TaqMan Sonden, Molecular Beacons, FRET Sonden, „Scorpions“, Sunrise™ Primer oder LUX™-Primer) erfolgen. Aufgrund der Proportionalität von Fluoreszenzsignal und Kopienzahl des zu amplifizierenden Moleküls kann mit Hilfe von definierten Standards eine exakte Mengenbestimmung der zu untersuchenden Probe durchgeführt werden (absolute Quantifizierung). Alle in dieser Arbeit aufgeführten Primer und Sonden wurde mit Hilfe des Programms Primer Express 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). ausgewählt.

In allen eingesetzten Kits wurde dTTP durch dUTP ersetzt und in die Amplifikate eingebaut. Mit diesem Einbau wurden PCR Amplifikate empfänglich für Degradation durch die Uracil DNA Glycosylase (UNG), wobei native DNA Matrizen davon nicht betroffen waren (Longo et al., 1990). Optional konnte dieser Schritt eingefügt werden, wenn Probleme mit Kontaminationen auftraten, um sicherzustellen, dass keine Amplifikatkontaminationen vorlagen.

#### 2.10.14.2.1 Plasmid-Standards zur absoluten Quantifizierung

Zur absoluten Quantifizierung wurden Plasmide mit definierter Teilchenzahl in *Aqua bidest* oder Tris Puffer pH 8,0 titriert und eingesetzt. Die Plasmide wurden zuerst linearisiert (2.10.4) und anschließend über ein Agarosegel aufgereinigt (2.10.6.2). Zur Berechnung der Teilchenzahl benötigt man die DNA Konzentration der Probe (2.10.3) und die Größe des Plasmids. Daraus kann die Teilchenzahl nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Teilchenmenge [Plasmide/}\mu\text{l]} = \frac{6 \times 10^{23} \text{ [Kopien / mol]} \times \text{Konzentration [g/}\mu\text{l]}}{\text{MW [g/mol]}}$$

Konzentration: Plasmid-Konzentration in g/ $\mu$ l

MW für dsDNA: Plasmidgröße [bp] x 660 Daltons/bp

#### 2.10.14.2.2 LightCycler qPCR

Alle LightCycler qPCRs wurden ausschließlich mit SYBR-Green durchgeführt. SYBR-Green ist ein Farbstoff spezifisch für dsDNA. Während der DNA Synthese kann SYBR-Green an die amplifizierten PCR Produkte binden und die dabei entstehende Fluoreszenz gemessen werden. Unabdingbar für die genaue Quantifizierung mit SYBR-Green ist die Erstellung einer

Schmelzkurve am Ende jeder PCR, da SYBR-Green unspezifisch an jede synthetisierte dsDNA bindet.

Bevor der qPCR Ansatz mit dem LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche) zusammenpipetiert werden konnte, musste ein „Hot Start“ Reaktionsmix angesetzt werden. Dazu wurde das Enzym zu dem PCR Master Mix gegeben. Dieser so hergestellte Mix war bei -20°C für maximal 3 Monate, bei 4°C eine Woche haltbar.

#### LightCycler qPCR Ansatz mit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
10x LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	2µl	1x
Primer-for (10µM)	1µl	0,5µM
Primer-rev (10µM)	1µl	0,5µM
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2,4µl	4mM
H <sub>2</sub> O PCR Grade	11,6µl / 10,6µl (UNG)	
DNA	2µl	≤ 50ng genomische DNA
UNG (optional)	1µl	1U
Endvolumen	20µl	—

Der Reaktionsmix wurde in Glaskapillaren überführt, diese mit einem Deckel verschlossen und bei maximal 700xg für 5s abzentrifugiert. Anschließend wurden sie in das Probenkarussell des LightCyclers gesetzt.

#### LightCycler qPCR Profil mit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I

UNG Behandlung (optional)	2min	50°C		Zur Vermeidung von Amplifikatkontaminationen
Initialer Aktivierungsschritt	10min	95°C	Ramp 20°C/s	Aktivierung der FastStart Taq DNA Polymerase
<b>3-Schritt Cycling</b>				
Denaturierung	15s	95°C	Ramp 20°C/s	
Annealing	30s	62°C	Ramp 20°C/s	
Extension (sec)	Amplifikatlänge (bp)/25	72°C	Ramp 20°C/s	Daten Akquisition „single mode“
Zyklenzahl	50			
<b>Schmelzkurve</b>				
Denaturierung	0s	95°C	Ramp 20°C/s	
Annealing	15s	65°C	Ramp 20°C/s	
		65-95°C	Ramp 0,1°C/s	kontinuierliche Daten Akquisition
Ende	∞	40°C		

Alternativ zum LightCycler PCR Kit wurde auch ein Kit von QIAGEN benutzt. Der Reaktionsmix wurde wie unten angegeben pipettiert und im Weiteren analog wie der Reaktionsmix von Roche behandelt. Änderungen im PCR Profil sind unten angegeben.

#### LightCycler qPCR Ansatz mit QuantiTect SYBR Green PCR Kit

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
2xQuantiTect SYBR Green Master Mix	10µl	1x
Primer-For (10µM)	2µl	1µM
Primer-Rev (10µM)	2µl	1µM
RNase freies H <sub>2</sub> O (im Kit enthalten)	4µl / 3µl (UNG)	—
DNA	2µl	≤ 1µg
UNG (optional)	1µl	1U
Endvolumen	20µl	—

#### LightCycler qPCR Profil mit QuantiTect SYBR Green PCR Kit

UNG Behandlung (optional)	2min	50°C		Zur Vermeidung von Amplifikatkontaminationen Aktivierung der HotStar Taq DNA Polymerase
Initialer Aktivierungsschritt	15min	95°C	Ramp 20°C/s	
<b>3-Schritt Cycling</b>				
Denaturierung	15s	94°C	Ramp 20°C/s	
Annealing	30s	62°C	Ramp 20°C/s	
Extension	15s	72°C	Ramp 20°C/s	Daten Akquisition „single mode“
Zyklenzahl	50			
<b>Schmelzkurve</b>				
Denaturierung	15s	98°C	Ramp 20°C/s	
Annealing	15s	65°C	Ramp 20°C/s	
		65-94°C	Ramp 0,1°C/s	kontinuierliche Daten Akquisition
Ende	∞	40°C		

#### **2.10.14.2.3 TaqMan qPCR**

##### TaqMan Ansatz mit QuantiTect SYBR Green PCR Kit für TaqMan 7700 und 7500

Die Proben wurden auf dem TaqMan 7700 und TaqMan 7500 wie unter 2.10.14.2.2 beschrieben angesetzt. Unterschiede in der Handhabung zwischen den beiden Geräten waren folgende: die Primer wurden in einer Endkonzentration von 0,75µM eingesetzt, um die Entstehung von Primer Dimeren in der Negativkontrolle oder in den Proben zu verhindern. Beim Schließen der PCR Gefäße (8er Streifen) war darauf zu achten, dass die für das jeweilige Gerät passenden Deckel (8er Streifen) verwendet wurden. Im TaqMan 7700

wurden abgerundete Deckel, im TaqMan 7500 Flachdeckel verwendet. Die Verwendung so genannter *optical caps* war für die Versuche nicht nötig, da die Detektion mit normalen Deckeln ebenso gut verläuft.

#### TaqMan 7700 PCR Profil

UNG Behandlung (optional)	2min	50°C	Zur Vermeidung von Amplifikatkontaminationen Aktivierung der HotStar Taq DNA Polymerase
Initialer Aktivierungsschritt	15min	95°C	
<b>3-Schritt <i>Cycling</i></b>			
Denaturierung	15s	94°C	
Annealing	30s	62°C	
Extension	30s	72°C	Daten Akquisition
Zyklenzahl	50		
<b>Schmelzkurve</b>			
Denaturierung	15s	95°C	
Annealing	30s	60°C	
<i>Set Ramp Time</i>	19:59	60-95°C	kontinuierliche Daten Akquisition
Denaturierung	15s	95°C	
Ende	∞	25°C	

#### TaqMan 7500 PCR Profil

UNG Behandlung (optional)	2min	50°C	Zur Vermeidung von Amplifikatkontaminationen Aktivierung der HotStar Taq DNA Polymerase
Initialer Aktivierungsschritt	15min	95°C	
<b>3-Schritt <i>Cycling</i></b>			
Denaturierung	15s	94°C	
Annealing	30s	62°C	
Extension	45s	72°C	Daten Akquisition
Zyklenzahl	50		
<b>Schmelzkurve</b>			
Denaturierung	15s	95°C	
Annealing	1min	60°C	
<i>Set Ramp Time</i>	auto		
Denaturierung	15s	95°C	

Auf beiden TaqMan Geräten wurden außer SYBR-Green auch TaqMan Sonden (*dual labeled probes*) eingesetzt. Der Einsatz von Sonden hat den Vorteil, dass die Detektion sehr spezifisch ist, da nur Amplifikate detektiert werden, an welchen die Sonde auch bindet. Die Sonden sind an ihrem 5'-Ende mit einem Reporter und am 3'-Ende mit einem Quencher versehen. Bindet nun die Sonde auf ssDNA, kann die Sonde durch die 5'→3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase abgebaut werden (Holland et al., 1991), was eine räumliche Trennung von Reporter und Quencher zur Folge hat. Die vom Reporter emittierte und nicht mehr durch den Quencher unterdrückte Fluoreszenz kann detektiert werden. Dabei ist der Anstieg der Fluoreszenzintensität proportional zum gebildeten Produkt.

TaqMan Ansatz mit QuantiTect Probe PCR Kit für TaqMan 7700 und 7500

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
2×QuantiTect Probe PCR Master Mix	10µl	1×
Primer-For (10µM )	2µl	1µM
Primer-Rev (10µM)	2µl	1µM
DNA	2-5µl	≤ 1µg
RNase freies H <sub>2</sub> O	variabel	—
UNG (optional)	1µl	1U
Endvolumen	20µl	—

Die PCR mit TaqMan Sonden wurde als sogenannte *two-step* PCR durchgeführt, d.h. es gab einen gemeinsamen Annealing/Extension Schritt.

TaqMan Profil mit QuantiTect Probe PCR Kit für TaqMan 7700 und 7500

UNG Behandlung (optional)	2min	50°C	Zur Vermeidung von Amplifikatkontaminationen
Initialer Aktivierungsschritt	15min	95°C	Aktivierung der HotStar Taq DNA Polymerase
<b>2-Schritt <i>Cycling</i></b>			
Denaturierung	15s	94°C	
Annealing/Extension	1min	60°C	Daten Akquisition
Zykluszahl	50		

Das TaqMan 7500 Real-Time PCR Gerät besitzt, im Gegensatz zum TaqMan 7700, 5 Filter, welche Fluoreszenzen unterschiedlicher Wellenlänge detektieren können (2.11.4.2). In allen genannten Kits ist als passive Referenz ein Farbstoff (ROX) enthalten, welcher in Filter D detektiert wurde. Diese passive Referenz diente dazu, die Reportersignale in den einzelnen Ansätzen zu normalisieren. Bei allen oben genannten Kits war die ROX Fluoreszenz höher als die Fluoreszenz des Reporters. Da es nicht möglich war, ROX niedriger konzentriert einzusetzen, wurde überwiegend der Original Kit von Applied Biosystems für dieses Gerät verwendet. Der Ansatz entsprach dem des QIAGEN Kits, da der Kit ebenfalls einen 2x PCR Master Mix enthielt, nur das TaqMan Profil änderte sich.

TaqMan Profil mit TaqMan Universal Master Mix für TaqMan 7500

UNG Behandlung (optional)	2min	50°C	Zur Vermeidung von Amplifikatkontaminationen
Initialer Aktivierungsschritt	10min	95°C	Aktivierung der AmpliTaq Gold DNA Polymerase
<b>2-Schritt <i>Cycling</i></b>			
Denaturierung	15s	95°C	
Annealing/Extension	1min	60°C	Daten Akquisition
Zykluszahl	50		

## 2.11 Molekularbiologische Standardmethoden RNA

Um Genexpressionen zu analysieren oder um *in vitro* Transkripte herzustellen, ist es von größter Wichtigkeit, intakte und saubere RNA zu gewinnen. Ribonukleasen (RNasen) stellen bei der Gewinnung und beim Umgang mit RNA ein großes Problem dar, weil sie die RNA zerstören und extrem stabil sind. Deshalb ist die Benutzung sauberer, RNase-freier Geräte und Lösungen und das Tragen von Handschuhen unerlässlich.

### 2.11.1 Vorbehandlung von Geräten und Flüssigkeiten

Generell wurden alle Lösungen mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandeltem, RNase-freiem Wasser hergestellt. Für DEPC Behandlung wurde  $H_2O_{\text{demin.}}$  mit 0,2% DEPC versetzt und unter Schütteln über Nacht inkubiert. Das mit DEPC behandelte Wasser wurde am nächsten Tag autoklaviert. Elektrophoresekammern und Schlitten wurden ausschließlich für RNA Gele benutzt, nach Gebrauch in 3%  $H_2O_2$  inkubiert und danach mit DEPC-behandeltem  $H_2O$  gespült.

### 2.11.2 Isolierung von RNA

Zur RNA Isolierung wurden entweder der RNeasy Mini Kit oder der RNeasy Plus Mini Kit benutzt. Die Kits unterscheiden sich nur darin, dass im RNeasy Plus Kit ein Zentrifugationsschritt über eine Säule, um genomische DNA zu eliminieren, vorgeschaltet ist. Das Prinzip beider Kits beruht auf der Bindung von RNA (größer 200 Basen) an eine Silica Gel Membran unter Hochsalzbedingungen. RNA wird aus den Proben in Anwesenheit eines stark denaturierenden Guanidin-Isothiocyanat (GITC) Puffers, der vorhandene RNasen inaktiviert, isoliert, danach reversibel an eine Silica Gel Säule gebunden, gewaschen und eluiert.

Gewebestücke wurden in einer definierten Menge GITC-haltigem Puffer, der mit  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) versetzt war, aufgenommen und in der Mixer Mill (2.10.1.1) für 3min bei 30 Hertz homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat bei maximaler Geschwindigkeit für 3min zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde weitergearbeitet. Falls RNA aus Zellkulturen gewonnen wurde, wurden die Zellen ebenfalls mit GITC-haltigem Puffer versetzt, auf eine QIAshredder Säule (QIAGEN) gegeben und bei maximaler g-Zahl für 2min zentrifugiert.

Versuchsprotokoll siehe:

<http://www1.qiagen.com/products/dnacleanup/qiaexiigelextractionssystem/qiaexiigelextractionkit.aspx>

Die Homogenate wurden dann mit 70% Ethanol versetzt und auf eine RNeasy Säule gegeben. Es folgten zwei Waschschrte mit unterschiedlichen Waschpuffern. Die RNA wurde im Anschluss in 30 bis 50 $\mu$ l RNase-freiem Wasser eluiert. Falls während der Aufreinigung ein (optionaler) DNase Verdau eingefügt wurde, wurde nur mit der Hälfte des ersten Waschpuffers gewaschen. 10 $\mu$ l DNase I (QIAGEN) wurden mit 70 $\mu$ l Puffer versetzt,

auf die Säule gegeben und für 15min bei RT inkubiert. Danach wurde mit der zweiten Hälfte des ersten Waschpuffers gewaschen und das Protokoll wie oben beschrieben weitergeführt. Der RNeasy Kit wurde auch zum Aufreinigen von *in vitro* Transkripten (2.11.3) verwendet. Dazu wurde die Probe auf 100µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt und mit 350µl GITC/β-ME-haltigem Puffer versetzt. Nach Zugabe von 250µl Ethanol wurde der Ansatz auf die RNeasy-Säule gegeben, zweimal gewaschen und in 30 bis 50µl RNase-freiem Wasser eluiert.

Versuchsprotokolle siehe:

<http://www1.qiagen.com/literature/protocols/RNeasyMini.aspx>

<http://www1.qiagen.com/products/rnastabilizationpurification/rneasysystem/rneasyplusminikit.aspx>

### 2.11.3 Herstellung von *in vitro* Transkripten

Für quantitative *real-time* RT-PCRs (RT-qPCR) wurden zur absoluten Quantifizierung *in vitro* Transkripte als Standards eingesetzt, die mit dem MEGAscript Kit (Ambion) hergestellt wurden.

Zuerst wurden 10µg eines linearisierten Vektors, der die gewünschte Matrizen DNA enthält (2.10.4) auf ein Gel aufgetragen (2.10.5), mit dem QIAEX II Kit (2.10.6.1) aufgereinigt, in 20µl RNase freiem Wasser isoliert und die DNA Konzentration bestimmt (2.10.3). Standardmäßig wurde für die *in vitro* Transkription folgender Reaktionsansatz verwendet:

Volumen/Reaktion	Komponente
ATP Lösung	2µl
CTP Lösung	2µl
GTP Lösung	2µl
UTP Lösung	2µl
10x Puffer	2µl
Enzym Mix	2µl
linearisierte DNA	1µg
ad 20µl	Nuklease-freies H <sub>2</sub> O

Dieser Ansatz wurde für 2h bei 37°C inkubiert. Danach wurde 1µl der im Kit befindlichen Dnase I dazugegeben, noch einmal für 15min bei 37°C inkubiert und dann über den RNeasy Kit (2.11.2) aufgereinigt.

Versuchsprotokoll siehe:

<http://www.ambion.com/catalog/CatNum.php?1330>

#### 2.11.3.1 Einstellen der *in vitro* Transkripte für RT-qPCR

Nach Herstellung und Aufreinigung der *in vitro* Transkripte wurde deren Konzentration bestimmt (2.10.3) und die Transkriptmenge/µl wie folgt bestimmt:



$$\text{Teilchenmenge [Transkripte}/\mu\text{l}] = \frac{6 \times 10^{23} \text{ [Kopien / mol]} \times \text{Konzentration [g}/\mu\text{l}]}{\text{MW [g/mol]}}$$

Konzentration: RNA Konzentration in g/ $\mu$ l

MW für ssRNA: Größe *in vitro* Transkript [b] x 340 Daltons/b

## 2.11.4 Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Um definierte Bereiche aus Gesamt-RNA zu amplifizieren, wurde der OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN) verwendet. Der Enzym Mix dieses Kits enthält eine Kombination von Omniscript Reverser Transkriptase, Sensiscript Reverser Transkriptase und HotStar Taq Polymerase. Die Enzymkombination der Reversen Transkriptasen ermöglicht eine optimale reverse Transkription sowohl aus Ansätzen mit sehr hohem als aus Ansätzen mit sehr niedrigem RNA Gehalt. Der Vorteil des Kits liegt darin, dass nicht erst mit Oligo-dT Primern cDNA synthetisiert werden muss, die dann in eine PCR eingesetzt wird, sondern dass die eingesetzte RNA selektiv mit sequenzspezifischen Primern in cDNA umgeschrieben und diese dann amplifiziert wird.

### 2.11.4.1 RT-PCR für Klonierungszwecke

#### Standard OneStep RT-PCR Ansatz

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
5x QIAGEN OneStep RT-PCR Puffer	10 $\mu$ l	1x
dNTP Mix (10mM je dNTP)	2 $\mu$ l	0,4 $\mu$ M je dNTP
Primer-for (10 $\mu$ M)	3 $\mu$ l	0,6 $\mu$ M
Primer-rev (10 $\mu$ M)	3 $\mu$ l	0,6 $\mu$ M
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzym Mix	2 $\mu$ l	
RNA		1pg-2 $\mu$ g/Reaktion
RNase freies H <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu$ l	—
Endvolumen	50 $\mu$ l	—

#### Standard OneStep RT-PCR Bedingungen

Reverse Transkription	30min	50°C	Temperatur der Reversen Transkription kann auf bis zu 60°C erhöht werden
Initialer PCR Aktivierungsschritt	15min	95°C	Aktivierung der HotStar Taq DNA-Polymerase, Denaturierung Reverser Transkriptase
3-Schritt <i>Cycling</i>			
Denaturierung	30-60s	94°C	

Annealing	30-60s	50-68°C	In Abhängigkeit von der Primer Sequenz
Extension	60s/1kbp	72°C	
Zyklenzahl	30-35		
Abschließende Extension	10min	72°C	
Ende	∞	4°C	

### 2.11.4.2 TaqMan RT-qPCR

Alle Transkriptanalysen wurden mit der RT-qPCR durchgeführt. Hierbei dienten – analog zur qPCR – auf eine definierte Teilchenzahl eingestellte *in vitro* Transkripte als externe Standards zur Quantifizierung. Um Proben direkt miteinander vergleichen zu können, wurden diese im Duplex Ansatz, also pro Reaktion 2 Primerpaare und 2 unterschiedliche markierte Sonden, quantifiziert. Die Duplex RT-qPCRs liefen ausschließlich auf dem TaqMan 7500. Dieses Gerät besitzt, wie schon in 2.10.14.2.3 erwähnt, fünf Filter, in denen folgenden Fluoreszenzen detektiert werden:

Filter	Fluoreszenz
1	Fam, SYBR-Green
2	Joe, Hex
3	TAMRA
4	ROX
5	Cy-5

Maximal können in diesem Gerät 4 Farben gleichzeitig detektiert werden (bedingt durch ROX Fluoreszenz in Filter 4). Für Duplex Ansätze wurden nur Fluoreszenzen aus den Filtern 1 und 2 eingesetzt (Fam + Joe oder Fam + Hex), die dafür verwendeten Sonden wurden nicht mehr mit TAMRA als Quencher benutzt, sondern mit einem sogenannten *Black Hole* Quencher markiert, um Überstrahlungen aus dem Filter 3 zu vermeiden.

#### Singleplex RT-qPCR Ansatz

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
5x QIAGEN OneStep RT-PCR Puffer	5µl	1x, 2,5mM MgCl <sub>2</sub>
dNTP Mix (10mM je dNTP)	1,67µl	0,67mM
Primer-for (10µM)	2,5µl	1µM
Primer-rev (10µM)	2,5µl	1µM
Sonde (10µM)	0,66µl	0,264µM
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzym Mix	1µl	
ROX (10µM)	0,33µl	0,132µM
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,5µl	1,5mM
RNA	≤ 1µg	
RNase freies H <sub>2</sub> O	ad 25µl	
Endvolumen	25µl	—

Duplex RT-qPCR Ansatz

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
5x QIAGEN OneStep RT-PCR Puffer	5µl	1x, mit 2,5mM MgCl <sub>2</sub>
dNTP Mix (10mM je dNTP)	1,67µl	0,67mM
Primer1-for (10µM)	1µl	0,4µM
Primer1-rev (10µM)	1µl	0,4µM
Sonde1 (10µM)	0,66µl	0,264µM
Primer2-for (10µM)	1µl	0,4µM
Primer2-rev (10µM)	1µl	0,4µM
Sonde2 (10µM)	0,66µl	0,264µM
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzym Mix	1µl	
ROX (10µM)	0,33µl	0,132µM
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,5µl	1,5mM
RNA	≤ 1µg	
RNase freies H <sub>2</sub> O	ad 25µl	
Endvolumen	25µl	—

Singleplex und Duplex RT-qPCR Bedingungen

Reverse Transkription	30min	50°C	
Initialer PCR Aktivierungsschritt	15min	95°C	Aktivierung der HotStar Taq DNA Polymerase, Denaturierung Reverser Transkriptase
<i>2-Schritt Cycling</i>			
Denaturierung	15s	94°C	
Annealing/Extension	60s	60°C	Daten Akquisition
Zyklenzahl	50		

## 2.12 Immunologische Methoden

### 2.12.1 MACS Separation

Das Prinzip der magnetischen Zellseparation basiert auf der Kopplung (para)magnetischer Partikel (*Micro-Beads*) an den Fc-Teil spezifischer monoklonaler Antikörper. Bei Bindung der Antikörper an epitoptragende Zellen können diese in einem Magnetfeld einer dafür vorgesehenen Separationseinheit zurückgehalten werden, während ungebundene Zellen die Säule durchlaufen. Die Elution der Zellen erfolgt durch Spülen der Säulen mit Druck außerhalb des Magnetfeldes (Miltenyi et al., 1990).

Die MACS Separation wurde in dieser Arbeit verwendet, um die nichtparenchymalen Zellen (2.5.2) aufgrund der unterschiedlichen Expression ihrer Oberflächenrezeptoren, insbesondere die ME-9F1-positiven Zellen (LSEC) anzureichern. Die Anreicherung erfolgte

entweder mit dem autoMACS oder mit MACS Säulen. Falls der autoMACS für Separationen verwendet wurde, ist dies explizit angegeben.

### 2.12.1.1 Separation über autoMACS

#### 5x MACS Puffer

EDTA	10mM	1,86g
BSA	2,5% (w/v)	12,5g
mit PBS ad 500ml		

Lösung steril filtrieren und vor Gebrauch 1:5 mit sterilem PBS verdünnen.

#### 10x Spüllösung

EDTA	20mM	3,72g
mit PBS ad 500ml		

Lösung steril filtrieren und vor Gebrauch 1:10 mit sterilem PBS verdünnen.

Der autoMACS wurde verwendet, wenn aus der isolierten nichtparenchymalen Fraktion der Leber mehrere Zellpopulationen zu separieren waren. Dieses Gerät erlaubte eine automatisierte Zellseparierung aller säulenbezogener Schritte, wie Äquilibration, Probenaufnahme und Elution positiver und negativer Fraktionen.

Nach dem Zählen der zu separierenden Zellen wurden diese in MACS Puffer aufgenommen und mit der im Protokoll angegebenen Menge an *Micro-Beads* versetzt. Standardmäßig wurden  $1 \times 10^7$  Zellen je nach Protokoll in 50 bis 90  $\mu$ l Puffer aufgenommen und mit 5 bis 20  $\mu$ l *Micro-Beads* versetzt. Falls mehr Zellen in die Separation eingesetzt wurden, wurden *Bead-* und Puffermengen nach oben angepasst. Die Bindekapazität der autoMACS Säulen von  $2 \times 10^8$  markierten Zellen in  $4 \times 10^9$  Gesamtzellen durfte dabei nicht überschritten werden. Der Ansatz wurde für 15min bei 4°C inkubiert und danach mit MACS Puffer gewaschen, um ungebundene *Micro-Beads* zu entfernen. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 1ml MACS Puffer pro  $1 \times 10^8$  Zellen aufgenommen und standardmäßig über das Programm „posseld“ separiert. Dieses Programm reinigte die Zellen über zwei Säulen auf. Dadurch wurde eine größtmögliche Reinheit erzielt.

### 2.12.1.2 Separation über MACS Säulen

#### Benötigtes Material:

- MACS Puffer (2.12.1.1)
- MACS MultiStand (Miltenyi Biotech)
- Mini / Midi Magnet (Miltenyi Biotech)
- LS / MS Säulen (Miltenyi Biotech)
- *Pre-Separation* Filters (Miltenyi Biotech)

Erforderte die experimentelle Fragestellung, dass Zellen nach der Separation kultiviert wurden, wurde die Separation unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Abhängig von der

Zellzahl wurden entweder LS (maximal  $2 \times 10^9$  Gesamtzellen und  $1 \times 10^8$  positive Zellen) oder MS Säulen (maximal  $2 \times 10^8$  Gesamtzellen und  $1 \times 10^7$  positive Zellen) verwendet. Die Zellen wurden, wie unter 2.12.1.1 beschrieben, mit *Micro-Beads* markiert, inkubiert, gewaschen und in Puffer aufgenommen. Bevor die Zellen zur Separation auf die Säule gegeben wurden, wurde diese mit MACS-Puffer äquilibriert und ins Magnetfeld gebracht.

Zellverklumpungen können die Säule verstopfen. Aus diesem Grund wurden die Zellen vorher entweder über einen  $40 \mu\text{M}$  Zellfilter oder über einen *Pre-Separation* Filter ( $30 \mu\text{m}$  Maschenweite), der auf die Säule gesetzt wurde, gegeben. Die Zellen wurden so vereinzelt. Die mit *Micro-Beads* markierten Zellen binden an die Säule, während nicht markierte Zellen durch zwei Waschschriffe entfernt werden. Anschließend erfolgte die Elution der positiven Zellen, indem die Säule aus dem Magnetfeld entnommen und mit 1ml (MS Säule) oder 5ml (LS Säule) MACS Puffer gespült wurde. Danach wurden die Zellen gezählt und je nach Fragestellung weiter behandelt.

## 2.12.2 Zytofluorometrische Analysen

Die durchflusszytometrische Detektion von Zelloberflächenmolekülen erfolgten in einem FACSort (*fluorescence activated cell sorter*; Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg), welcher mit einem zweiten Laser aufgerüstet ist und somit wie ein FACSCalibur zur 4-Farben Analyse benutzt werden kann. Die Separation *ex vivo* gewonnener Zellen wurde mittels eines Sort Systems (FACSVantage SE; Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg) in der FACS Core Facility der Universität Mainz durchgeführt.

### 2.12.2.1 Funktionsprinzipien des Durchflusszytometers und Datenakquisition

Die Durchflusszytometrie ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. Eine Anwendung besteht darin, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen auf Einzelzellebene zu dokumentieren.

Zur Messung zellmorphologischer Eigenschaften werden die Zellen aus einem Probenröhrchen durch Luftdruck in das Zytometer geleitet, wo sie einen Argonionenlaser, der monochromatisches Licht mit einer Wellenlänge von 488nm emittiert, passieren. Um zu gewährleisten, dass alle zu analysierenden Partikel einzeln durch denselben Punkt im Laserstrahl fließen, wird die Zellsuspension in eine partikelfreie Mantelflüssigkeit geleitet, die aus einem Röhrchen mit einer konischen Verengung in eine Quarzküvette mit einer kleinen Öffnung ( $70 \mu\text{m}$ ) fließt. Durch die Reduktion des Durchmessers im Probenstrom wird sowohl eine Vereinzelnung als auch eine hydrodynamische Fokussierung der Zellen erreicht (Haynes, 1988).

Das Streulicht der Zellen, die den Laserstrahl passieren, wird über ein System aus verschiedenen Filtern und Spiegeln getrennt und von verschiedenen Photodetektoren registriert. Das von den Zellen gestreute Licht wird mit Hilfe von zwei Detektoren gemessen. Nach vorne in einem Winkel von 2 bis  $10^\circ$  abgelenkte Strahlen sind ein Maß für die Größe der gemessenen Zellen (*forward scatter* (FSC), oder Vorwärtsstreulicht) und das in einem

Winkel von 90°C abgestrahlte Licht ein Maß für die Zellgranularität (*sideward scatter* (SSC) oder Seitwärtsstreulicht).

Neben der Möglichkeit zur Bestimmung von zellmorphologischen Eigenschaften können im FACS durch die Verwendung fluorochromkonjugierter Antikörper spezifische Oberflächenantigene detektiert und quantifiziert werden. Fluorochrome können einzeln eingesetzt oder kombiniert werden, um gleichzeitig mehrere Antigene auf der Zelle nachzuweisen. Fluorochrome, die zur Immunfluoreszenzmarkierung von Zellantigenen verwendet werden, können durch das Laserlicht kurzzeitig in einen angeregten Zustand überführt werden. Beim Übergang des Fluorochroms zurück in den Grundzustand wird die Energie in Form eines Photons mit einer charakteristischen Wellenlänge frei. Diese Photonen werden von hochempfindlichen Photozellen (Photomultiplier) detektiert.

Teilweise spektrale Überlappungen der Emissionsspektren der Fluorochrome können elektronisch kompensiert werden, indem der Teil des Fluoreszenzsignals der dieser Überlappung entspricht, vom anderen Fluoreszenzsignal subtrahiert wird. Dieser Vorgang wird als Kompensation bezeichnet.

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper waren entweder FITC (Messung im FL-1 Kanal), PE (Messung im FL-2 Kanal), PE-Cy5 (Messung im FL-3 Kanal) oder APC (Messung im FL-4 Kanal) konjugiert.

Bei der Messung im Durchflusszytometer konnten anhand der Streulichtparameter tote Zellen (kleines Vorwärtsstreulicht und kleines Seitwärtsstreulicht) von lebenden Zellen unterschieden werden. Durch das Setzen von elektronischen Fenstern (*gates*) konnten definierte Zellpopulationen für Analysen ausgewählt werden. Die Auswertung der akquirierten Daten erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms Cellquest Pro (Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg).

### 2.12.2.2 Zellfärbungen

#### FACS Puffer

BSA	0,4% (w/v)	2g
EDTA	10mM	1,99g
NaN <sub>3</sub>	0,003% (w/v)	15mg
HEPES	20mM	2,383g
PBS		ad 500ml

Meist wurden Antikörper verwendet, die mit einem Fluorochrom gekoppelt waren und somit direkt eine Detektion am Durchflusszytometer gestatteten. Bei Biotin gekoppelten Antikörpern erfolgte die Markierung in einem weiteren Schritt mittels eines Fluorochrom konjugierten Zweitantikörpers.

Zur Färbung wurden 0,5 bis  $1 \times 10^6$  Zellen in 100µl FACS Puffer aufgenommen, mit dem entsprechenden Antikörper versetzt und für 15min bei 4°C inkubiert. Um unspezifische Fc-Rezeptor-vermittelte Bindungen zu reduzieren, wurden die Zellen vorher mit einem CD16/CD32 FcγIII/II Rezeptor Antikörper für 15min bei 4°C inkubiert. Danach wurde der Antikörper direkt dazugegeben. Nach einem Waschschrift erfolgte die Detektion am FACS.

Die Antikörper wurden entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt oder in einem Vorversuch austitriert.

### 2.12.2.3 Quantifizierung toter Zellen in Zellkulturen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Anteil toter Zellen in Zellkulturen bestimmt, um die Toxizität von HDAC Inhibitoren in der Zellkultur zu ermitteln (3.9.5). Allgemein lassen sich zwei Arten des Zellsterbens unterscheiden: die Apoptose und die Nekrose. Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods, der von der Zelle selbst durchgeführt wird. Dies unterscheidet die Apoptose von der Nekrose, die pathologisch bedingt durch externe Stimuli wie Gifte oder andere schädliche Einflüsse zum Zelltod führt. Die apoptotischen Zellen, deren Zellvolumen sukzessiv reduziert wird, lassen sich leicht von den nekrotischen Zellen unterscheiden, da bei diesen die Zelle anschwillt und die Plasmamembran zerstört wird.

Durch FACS Messungen ist es möglich, die Gesamtheit der apoptotischen und nekrotischen Zellen in einer Zellpopulation zu quantifizieren. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit Annexin V und Propidiumiodid gefärbt. Eine der frühesten Änderungen von apoptotischen Zellen ist der Wechsel des Plasmamembran Phospholipids Phosphatidylserin (PS), welches von der inneren zur äußeren Plasmamembran transloziert. Annexin V ist ein calciumabhängiges phospholipid-bindendes Protein, das eine hohe Affinität für PS hat und so in einem frühen Apoptosestadium an die Zellen bindet (Koopman et al, 1994; Vermes et al., 1995). Da der Wechsel von PS auch während der Nekrose eintritt, dient zur Untersuchung von apoptotischen und nekrotischen Zellen eine zweite Färbung mit Propidiumiodid. Durch diese zweite Färbung können die nekrotischen Zellen von den während der Isolierung beschädigten Zellen, die nur PI<sup>+</sup> sind, unterschieden werden.

#### 10x Bindepuffer:

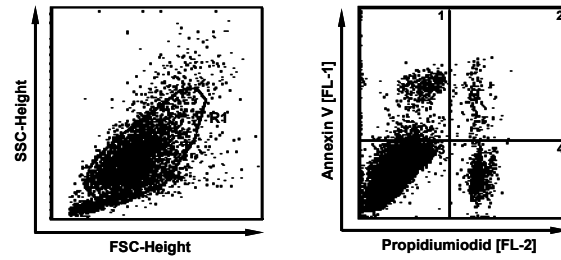
Hepes/NaOH pH 7,4	0,1M	2,38g
NaCl	1,4M	8,182g
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	25mM	0,368g
PBS		ad 100ml

Lösung steril filtrieren und bei 4°C lagern.

Vor Gebrauch Lösung 1:10 mit sterilem *Aqua bidest* verdünnen.

#### Propidiumiodid Lösung: 50µg/ml in PBS

Die zu messenden Zellen (MEF) wurden zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in Bindepuffer (1x10<sup>6</sup> Zellen/ml) aufgenommen und in 100µl Aliquots (1x10<sup>5</sup> Zellen) aufgeteilt. Zu den Aliquots wurden jeweils 5µl Annexin V dazugegeben und die Ansätze für 15min bei RT im Dunkeln inkubiert. Überschüssige Ak wurden ausgewaschen und die Zellen in 400µl Bindepuffer aufgenommen. Kurz vor der FACS Messung wurden pro Ansatz 2µl PI dazugegeben und die Zellen in FL-1 gegen FL-2 gemessen (Abb. 2.2).

**Abb. 2.2 Annexin V und PI Färbung von MEF**

Nach der Färbung mit Annexin V FITC und PI wurden die Zellen im FACS auf das elektronische Fenster R1 eingestellt und gemessen. Annexin V FITC wurde in FL-1 und PI in FL-2 aufgenommen. Im ersten Quadranten findet man apoptotische Zellen (Annexin V<sup>+</sup>), im zweiten Quadranten nekrotische Zellen (Annexin V<sup>+</sup>, PI<sup>+</sup>), im dritten Quadranten lebende (Annexin V<sup>-</sup>, PI<sup>-</sup>) Zellen und im vierten Quadranten beschädigte Zellen (PI<sup>+</sup>).



### 3 Ergebnisse

Die Leber ist ein Ort von CMV Pathogenese, Latenz und Reaktivierung, wobei insbesondere die zellulären Orte der CMV Latenz sowohl in der Leber als auch in anderen Organen noch nicht zweifelsfrei identifiziert sind. Bei hCMV konnte man in der Latenz virales Genom und latenzassoziierte virale Transkripte in einer geringen Zahl hämatopoetischer Zellen nachweisen (Kondo et al., 1994; Hahn et al., 1998; Übersicht: Streblow & Nelson, 2003; Übersicht: Mocarski et al., 2006); parallel dazu gelang für mCMV der Nachweis viraler Genome in myelomonozytären Zellen (Pollock et al., 1997). Demnach könnte das latente virale mCMV Genom durch die klonale Expansion von Granulozyten-Monozyten Vorläufern im Knochenmark vermehrt und über die Ausschleusung der Monozyten im Organismus verteilt werden. Da reife Makrophagen und DCs permissiv für eine produktive mCMV Infektion sind, kommen sie ebenfalls als zelluläre Orte der Virusreaktivierung in Betracht (Brautigam et al., 1979; Mitchell et al., 1996). Longitudinale Analysen für mCMV zeigten allerdings eine kontinuierliche Abnahme der Menge an viraler DNA in Knochenmark und Blut, während in verschiedenen Organen wie beispielsweise der Lunge lebenslang eine hohe Genomlast nachweisbar blieb (Kurz et al., 1997; Kurz et al., 1999, Übersicht: Reddehase et al., 2002). In Organen wie Leber, Lunge, Milz, Speicheldrüsen und Niere sind endotheliale Zellen (Mercer et al., 1988; Koffron et al., 1998) und/oder langlebige gewebeständige Makrophagen oder Histozyten (Koffron et al., 1998) diskutierte Kandidaten für zelluläre mCMV Latenz.

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung latent infizierter Zellpopulationen in der murinen Leber im murinen Modellsystem der mCMV Infektion nach experimenteller KMT und Etablierung von Latenz. Zur Unterscheidung der Herkunft (Spender oder Empfänger) latent infizierter Zellen wurde die KMT mit männlichen KM-Spendern in weibliche KM-Empfänger durchgeführt (Steffens et al., 1998b). Die zellulären Fraktionen der Leber, in welchen latente virale Genome nachweisbar waren, wurden hinsichtlich der Expression verschiedener Oberflächenrezeptoren sowie latenzassoziiierter viraler Genexpression genauer charakterisiert. Wichtige Voraussetzung für die Untersuchungen der einzelnen Zellfraktionen war die Etablierung von Separations- und Quantifizierungstechniken, welche es erlaubten, die latent infizierte Leber zuerst in ihre zellulären Bestandteile zu trennen und anschließend die aus diesen Fraktionen aufgereinigte DNA oder RNA auf Präsenz viraler Genome oder Genexpression zu testen. Nach der Charakterisierung der latent infizierten Zellen erfolgten Experimente zum *in vitro* Nachweis der Virusreaktivierung aus den isolierten Zellen. Abschließend sollte durch die Transplantation von KM aus latent infizierten Mäusen in bestrahlte unbehandelte Empfänger untersucht werden, ob eventuell vorhandene latent infizierte Zellen im KM transplantierbar sind und in der Leber des Empfängers erneut Latenz etablieren.

### 3.1 Etablierung einer qPCR zur Bestimmung viraler und zellulärer DNA

Die Etablierung einer mCMV-spezifischen qPCR ermöglichte erstmals eine exakte Quantifizierung der Anzahl viraler Genome pro Zelle. Um zwischen den Donor- und Rezipienten-abgeleiteten Zellen bei latenten mCMV Infektionen in einem getrenntgeschlechtlichen KMT-Modell zu unterscheiden (3.2), wurde zudem eine qPCR spezifisch für y-chromosomale DNA entwickelt. Alle in dieser Arbeit etablierten DNA Quantifizierungen wurden absolut durchgeführt mit Plasmiden als externen Standards.

#### 3.1.1 Konstruktion der Plasmid-Standards

Zur absoluten DNA Quantifizierung mit externen Standards wurden zwei Plasmide kloniert (pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy und pDrive\_IE3\_PTHrP\_Tdy), die jeweils ein Fragment eines mCMV Gens (*M55/gB* (Rapp et al., 1992) bzw. *ie3* (Keil et al., 1987)), ein zelluläres *single-copy* Gen (*pthrp*; Mangin et al., 1990) und ein y-chromosomales Gen (*tdy*; Gubbay et al., 1990) enthielten (Abb. 3.1). Die detaillierte Klonierungsstrategie des Plasmids pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy wurde bereits beschrieben (Simon et al. 2005), für das Plasmid pDrive\_IE3\_PTHrP\_Tdy wird die Klonierungsstrategie im Folgenden aufgeführt.

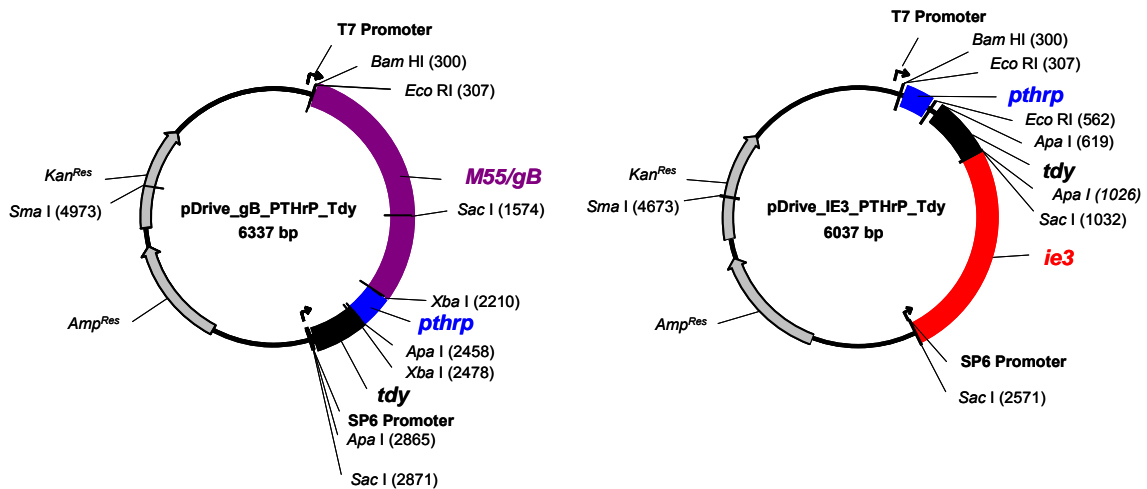
Zuerst wurde das Plasmid pDrive\_PTHrP als Zwischenkonstrukt 1 kloniert. Dazu wurde aus einem Schwanzstück einer männlichen Maus DNA isoliert (2.10.1.2), welche anschließend als *template* für die Amplifikation von *pthrp* und *tdy* diente. Mit dem *pthrp*-spezifischen Primerpaar PTHrP-7 und rcPTHrP-8 wurde ein 238bp Fragment aus der *pthrp* Sequenz (*GenBank Accession No.* M60056) von Nukleotidposition n126 bis n363 generiert, welches mittels UA-basierter Ligation (2.10.10) in den pDrive Vektor (QIAGEN) kloniert wurde.

Als Zwischenkonstrukt 2 wurde das Plasmid pDrive\_PTHrP\_Tdy generiert. Dazu wurde aus muriner DNA mit dem Primerpaar TdyGene\_for1\_Apa und TdyGene\_rev1\_Apa ein 421bp Fragment, das die *tdy* Sequenz von Nukleotidposition n70 bis n470 (*GenBank Accession No.* 287804) und an jedem Ende zusätzlich eine *Apa* I Restriktionsschnittstelle enthält, hergestellt. Nach Restriktion des Zwischenkonstrukts 1 (pDrive\_PTHrP) mit *Apa* I (2.10.4) und Dephosphorylierung des geschnittenen Vektors (2.10.8) wurde dieser mit dem ebenfalls mit *Apa* I verdauten *tdy* Fragment ligiert (2.10.9).

Zur endgültigen Konstruktion des Plasmids pDrive\_IE3\_PTHrP\_Tdy wurde das Zwischenkonstrukt 2 (pDrive\_PTHrP\_Tdy) mit *Sac* I linearisiert und dephosphoryliert. Aus dem mCMV-wt Virusstock wurde aus einem 20µl Aliquot virale DNA aufgereinigt (2.10.1.4). Mit dem Primerpaar IE3-Gene\_For1\_Sac und IE3-Gene\_Rev1\_Sac wurde mit der mCMV Virion DNA als *template*, von Nukleotidposition n177983 bis n179515 (*Genbank Accession No.* NC\_004065), ein 1553bp großes Amplifikat, mit jeweils einer zusätzlich angefügten *Sac* I Schnittstelle an beiden Enden, generiert. Nach Restriktion des Amplifikats mit *Sac* I wurde dieses in das zuvor mit *Sac* I linearisierte Zwischenkonstrukt 2 kloniert.

Für die Verwendung der beschriebenen Plasmide in einer qPCR wurden diese mit *Sma* I linearisiert und über ein Agarosegel aufgereinigt (2.10.5 und 2.10.6). Plasmidkarten von

pDrive\_IE3\_PTHrP\_Tdy und pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy mit den klonierungsrelevanten Restriktionsschnittstellen zeigt Abb. 3.1.



**Abb. 3.1 Plasmidkarten von pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy und pDrive\_IE3\_PTHrP\_Tdy**

Physikalische Karten der klonierten Plasmide, die als Standards zur Quantifizierung der viralen DNA Load, der Anzahl zellulärer Genome und des Anteils *tdy*-positiver Zellen eingesetzt wurden. Sie umfassen die mCMV Gene *ie3* (rot), *M55/gB* (violett), sowie das zelluläre Gen *pthrp* (blau) und das y-chromosomale Gen *tdy* (schwarz). Relevante Restriktionsschnittstellen sind angegeben. *Sma* I: Restriktionsschnittstelle zur Linearisierung des Plasmids. *Kan*<sup>Res</sup>: Kanamycin Resistenz, *Amp*<sup>Res</sup>: Ampicillin Resistenz.

### 3.1.2 qPCRs zur absoluten Quantifizierung von *M55/gB*, *ie3*, *pthrp* und *tdy*

Nachdem die beiden Plasmid-Standards pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy und pDrive\_IE3\_PTHrP\_Tdy kloniert vorlagen, erfolgte die Etablierung der qPCRs für *M55/gB*, *ie3*, *pthrp* und *tdy* auf zwei TaqMan Geräten (ABI PRISM™ 7700 Sequence Detector und 7500 Real-Time PCR System; Heid et al., 1996) und dem LightCycler (Wittwer et al., 1997). Die Primer für SYBR-Green und TaqMan Quantifizierungen und die TaqMan Sonden wurden mit dem Programm Primer Express 2.0 (Applied Biosystems, Foster City) ermittelt. Für die Konstruktion der TaqMan Sonden musste darauf geachtet werden, dass sie am 5'-Ende kein Guanin und in der gesamten Sequenz mehr Cytosin als Guanin besitzen, da durch vorhandene Guanine die Fluoreszenzintensität vermindert werden kann (Crockett et al., 2001). Des Weiteren sollte sich am 3'-Ende kein Adenin oder Thymin befinden und die Sonde in relativer Nähe zum 3'-Ende eines Primers liegen.

Zur Optimierung der qPCRs wurden log<sub>10</sub>-Titrations der zuvor mit *Sma* I linearisierten Plasmide pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy und pDrive\_IE3\_PTHrP\_Tdy verwendet (Übersicht: Rasmussen, 2001). Die Titrationsreihen wurden in silikonisierten Reaktionsgefäßen angesetzt, wobei ab der 10<sup>3</sup> Verdünnungsstufe zusätzlich noch 2 µg Poly-A<sup>+</sup> RNA (Roche, Mannheim) dazugegeben wurde, um unspezifische Bindungen der Plasmid-DNA an die Gefäßwand zu verhindern. Die optimale Amplifikatlänge für eine qPCR lag zwischen 70 und 200 Basen, wobei kürzere PCR Fragmente effizienter amplifiziert wurden als längere.

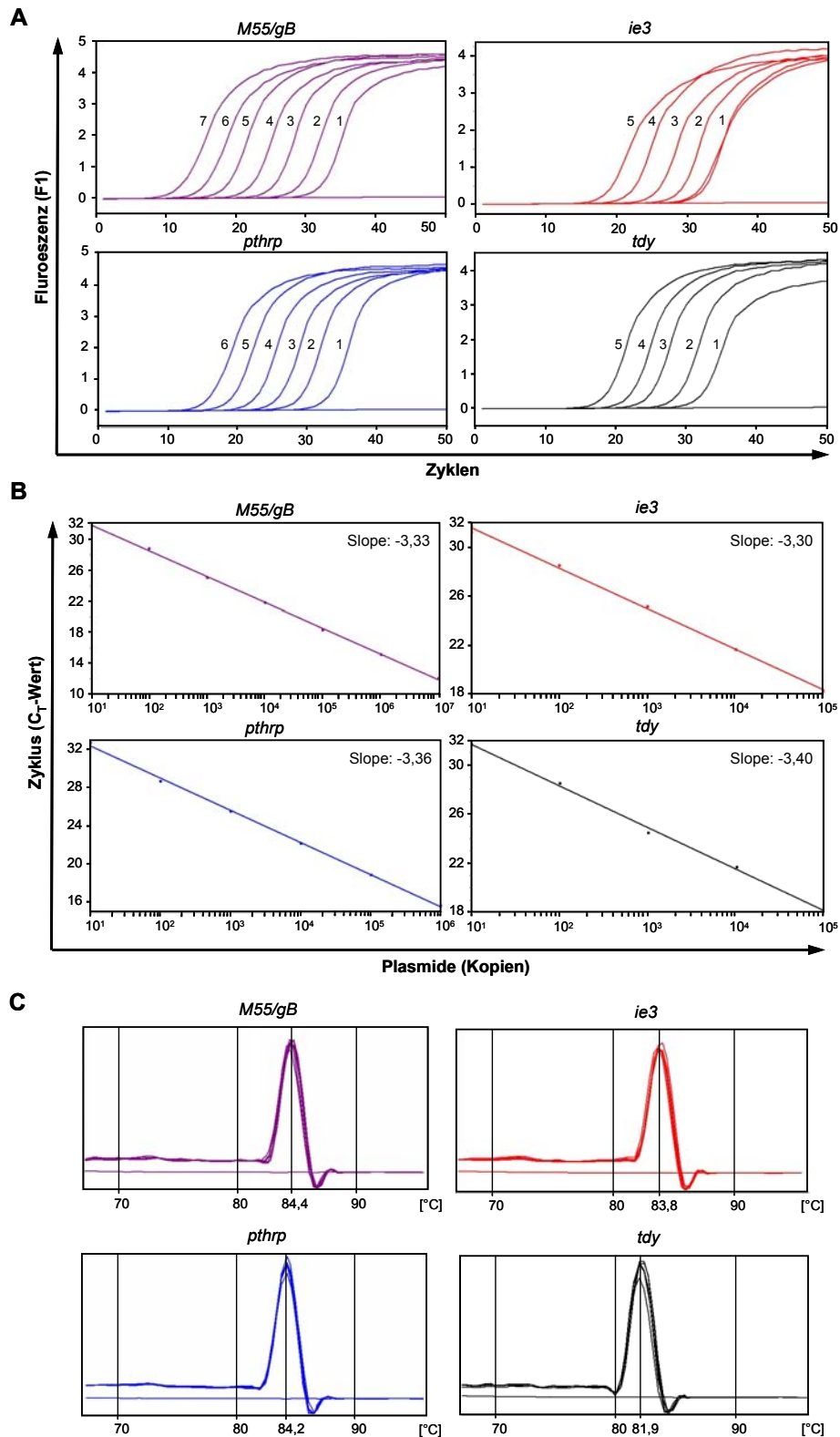
Unter optimalen Reaktionsbedingungen stiegen die Amplifikationskurven im TaqMan Amplifikationsprofil parallel an und hatten bei log<sub>10</sub>-Titrations den gleichen Abstand

zueinander. Dieser Abstand sollte idealerweise, unter der Voraussetzung einer Verdopplung des PCR Produkts pro Zyklus, 3,33 ( $2^{3,33}=10$ ) Zyklen betragen. Bei SYBR-Green Quantifizierungen wurde am Ende jeder Quantifizierung eine Schmelzkurve erstellt, bei der eventuell auftretende unspezifische Amplifikate darstellbar sind. Optimalerweise sollte die Schmelzkurve pro Ansatz nur ein Maximum bei jeweils gleicher Temperatur besitzen. Für alle PCR Ansätze mit SYBR-Green und mit TaqMan Sonden sollten die Amplifikationseffizienzen über 90% liegen.

### 3.1.2.1 LightCycler DNA Quantifizierungen mit SYBR-Green

Die LightCycler Quantifizierungen wurden ausschließlich mit SYBR-Green durchgeführt, wobei diverse Primerpaare getestet wurden (2.9.1.2). Hybridisierungs sonden wurden nicht getestet, da diese schwerer zu optimieren, teurer und in der Detektion nicht so sensitiv wie SYBR-Green sind (Honda & Oizumi, 2001). Die besten PCR Ergebnisse wurden letztendlich mit den Primern LCgB\_For3/Rev3 für *M55/gB*, LCIE3\_For1/Rev1 für *ie3*, LCTdy\_For1/Rev1 für *tdy* und LCPTHrP\_For2/Rev2 für *pthrp* erzielt. Für die genauen PCR Profile siehe 2.10.14.2.2. In Abb. 3.2A sind die Amplifikationsprofile der optimierten qPCRs mit linearisierten Plasmid-Standards für *M55/gB*, *ie3*, *pthrp* und *tdy* über mindestens 5  $\log_{10}$ -Stufen dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die exponentiellen Anstiege aller Amplifikationen nahezu parallel verlaufen und gleichmäßig titrieren. Die daraus resultierenden Standardkurven sind in Abb. 3.2B dargestellt. Durch den exponentiellen Anstieg jedes Plasmid-Standards wurde ein Schwellenwert, der sog. *threshold*, gelegt, wodurch die einzelnen  $C_T$ -Werte, die Schnittpunkte des *thresholds* mit den titrierten Plasmid-Standards, definiert wurden. In den jeweiligen Diagrammen ist die Steigung (*slope*) vermerkt, welche ein Maß für die Amplifikationseffizienz (E) ist. Die Berechnung erfolgte nach der Formel  $E = (10^{(-1/slope)}) - 1$  (QIAGEN, *Critical Factors for Successful Realtime PCR* 01/2004; Rutledge & Côté, 2003). Berechnungen der einzelnen Effizienzen ergaben für *M55/gB* 99,7%, für *ie3* 100,1%, für *pthrp* 98,4% und für *tdy* 96,8%. Wie für die Effizienz von *ie3* zu sehen war, können – bedingt durch Verschiebungen der einzelnen Titrationsstufen zueinander – Amplifikationseffizienzen über 100% auftreten, welche nur rechnerisch möglich sind. Um die viralen, bzw. die y-chromosomalen Standards mit dem Standard für das zelluläre *single-copy* Gen vergleichen zu können, sollten die Abweichungen der Amplifikationseffizienzen ( $\Delta E$ ) nicht mehr als 5% betragen (Roche Molecular Biochemicals, *technical Note No. LC 10/2000*). Berechnungen ergaben für die Verhältnisse von *ie3* zu *pthrp* 1,7%, *M55/gB* zu *pthrp* 1,3% und *tdy* zu *pthrp* 1,6%. Die Forderung der maximal 5%igen Abweichung von  $\Delta E$  konnte demnach, wie in Abb. 3.2B eindeutig gezeigt, erfüllt werden.

Die aus den jeweiligen Ansätzen resultierenden Schmelzkurven der amplifizierten 115bp *M55/gB* ( $T_M = 84,4^\circ\text{C}$ ), 135bp *ie3* ( $T_M = 83,8^\circ\text{C}$ ), 142bp *pthrp* ( $T_M = 84,2^\circ\text{C}$ ) und 133bp *tdy* ( $T_M = 81,9^\circ\text{C}$ ) Amplikons sind in Abb. 3.2C dargestellt. Die einzelnen Maxima entsprachen den jeweiligen  $T_M$  Werten der Amplikons, wobei die Maxima der Schmelzkurven um  $\pm 0,5^\circ\text{C}$  schwanken konnten. Es war deutlich zu erkennen, dass alle Ansätze spezifisch sowohl für die Plasmid-Standards wie auch für Proben DNA (siehe Abb. 3.15) sind. Damit konnten Primer-Dimere und andere unspezifische PCR Amplifikate, die bei SYBR-Green Analysen ebenfalls als positiv definiert werden würden, eindeutig ausgeschlossen werden.



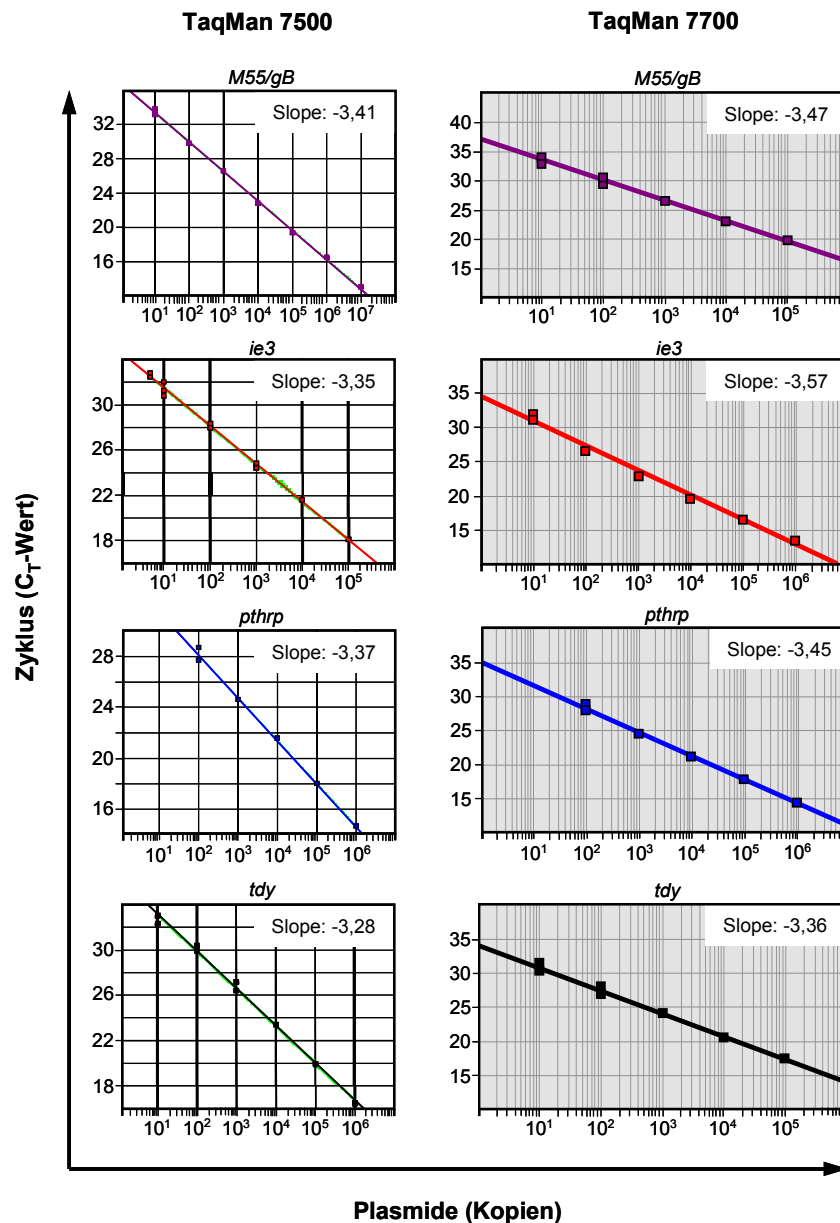
**Abb. 3.2 Ermittlung optimaler qPCR Bedingungen mit dem LightCycler**

A. Amplifikationsprofile der mit *Sma* I linearisierten Plasmid-Standards pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy und pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy für *M55/gB* (violett) von  $10^7$  bis  $10^1$  (markiert durch Exponenten), für *pthrp* (blau) von  $10^6$  bis  $10^1$ , für *ie3* (rot) und *tdy* (schwarz) jeweils von  $10^5$  bis  $10^1$  Plasmide pro Ansatz. Die horizontale Linie in jeder Abbildung kennzeichnet die  $H_2O$ -Kontrolle. Ein Schwellenwert (*threshold*) ist nicht zu sehen, da die  $C_T$ -Werte automatisch mit der so genannten *Second Derivative Maximum* Methode generiert wurden. B: Die Auftragung der Schnittpunkte der Plasmid-Standards mit dem Schwellenwert ( $C_T$ -Werte) gegen die korrespondierende Kopienzahl des Plasmid-Standards führte zu

den entsprechenden *M55/gB*, *ie3*, *pthrp* und *tdy* Standardkurven. Alle eingesetzten Plasmide wurden in  $\log_{10}$ -Schritten titriert (zur Berechnung der einzelnen Effizienzen siehe Text). C: Schmelzdiagramme der spezifischen *M55/gB*, *ie3*, *pthrp* und *tdy* Amplikons. Die Schmelzkurven wurden über einen Bereich von 65°C bis 95°C aufgenommen, um alle unspezifischen Amplifikationen detektieren zu können.

### 3.1.2.2 TaqMan DNA Quantifizierungen mit SYBR-Green

Aufgrund des geringen Probendurchsatzes im LightCycler - das Gerät kann nur maximal 32 Proben pro Lauf quantifizieren - wurden SYBR-Green PCRs auf zwei TaqMan Geräten etabliert. Diese Geräte ermöglichen einen Probendurchsatz von bis zu 96 Ansätzen pro Quantifizierung. Wie in 2.10.14.2.3 beschrieben, wurde die qPCR mit dem QuantiTect SYBR Green PCR Kit (QIAGEN, Hilden) durchgeführt bis auf den Unterschied, dass die Primer zur Vermeidung von Primer-Dimeren mit einer Endkonzentration von 0,75 $\mu$ M eingesetzt wurden. In Abb. 3.3 sind die Standardkurven nach Optimierung aller qPCRs auf beiden Geräten dargestellt, die daraus abgeleiteten Amplifikationsprofile und die Schmelzkurven befinden sich im Anhang Abb. 6.1. Alle im TaqMan 7500 und TaqMan 7700 generierten Amplifikationsprofile wurden semilogarithmisch dargestellt (Abb.6.1), um den *threshold* Wert, der bei allen Analysen manuell gesetzt wurde, besser definieren zu können. Da alle Standards und Proben parallel zueinander anstiegen, konnte der *threshold* bei unterschiedlichen Analysen leicht verschoben werden, um zu gewährleisten, dass die Schnittpunkte des *thresholds* mit den Proben im linearen Bereich lagen.



### Abb.3.3 Ermittlung optimaler qPCR Bedingungen am TaqMan

Die Auftragung der jeweiligen  $C_T$ -Werte gegen die korrespondierende Kopienzahl des Plasmid-Standards führte zu den entsprechenden Standardkurven, in welchen alle Plasmid-Standards  $\log_{10}$  titriert waren. Die Standards in der linken Spalte wurden mit dem TaqMan 7500, die Standards in der rechten Spalte mit dem TaqMan 7700 generiert. Folgende Titrationsreihen sind dargestellt: *M55/gB* (violett,  $10^7$  bis  $10^1$  Kopien für TaqMan 7500 bzw.  $10^5$  bis  $10^1$  Kopien für TaqMan 7700), *ie3* (rot,  $10^5$  bis 5 Kopien für TaqMan 7500 bzw.  $10^6$  bis  $10^1$  Kopien für TaqMan 7700), *pthrp* (blau,  $10^6$  bis  $10^1$  Kopien für TaqMan 7500 und 7700) und *tdy* (schwarz, von  $10^6$  bis  $10^1$  Kopien für TaqMan 7500 bzw.  $10^5$  bis  $10^1$  Kopien für TaqMan 7700). In allen Ansätzen wurden die Plasmid-Standards von  $10^7$  bis  $10^3$  einzeln, die  $10^2$  Titrationen als Duplikate und die  $10^1$  und 5 Titrationen als Triplikate eingesetzt (Die Berechnungen der Effizienzen aus den Steigungen siehe Text). Die dazugehörigen Amplifikationsprofile und die Schmelzkurven sind im Anhang in Abb. 6.1 dargestellt.

Der Berechnungen der Effizienzen für die jeweiligen Standards ergaben für den TaqMan 7500: *M55/gB* 96,5%, *ie3* 98,8%, *pthrp* 98,0% und *tdy* 101,8%, für den TaqMan 7700: *M55/gB* 94,2%, *ie3* 90,6%, *pthrp* 94,9% und *tdy* 94,4%. Wie bei der DNA Quantifizierung am LightCycler (3.1.2.1) befanden sich die Abweichungen der Amplifikationseffizienzen der quantifizierten Gene innerhalb des 5% Bereiches in Bezug auf *pthrp*. Bei allen titrierten

Standardkurven wurde darauf geachtet, dass der Korrelationskoeffizient ( $R^2$ ), welcher ein Maß für die Genauigkeit der Standardtitration ist, größer als 0,99 war (die Korrelationskoeffizienten sind in den Abbildungen nicht vermerkt).

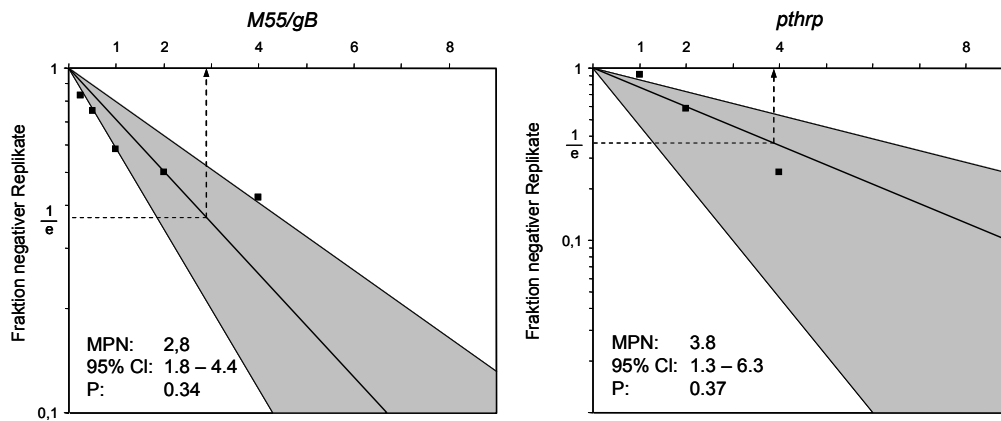
Nachdem die spezifischen qPCRs erfolgreich etabliert waren, dienten diese im Folgenden der Bestimmung der Detektionsgrenzen mittels *limiting dilution* für *M55/gB*, *pthrp* und *ie3*, d.h. wie viele virale und zelluläre Genome pro Probe nachweisbar waren. Die Bestimmungen wurden aufgrund der großen Probenzahl ausschließlich an den TaqMan Geräten durchgeführt. Dazu wurden zwei *limiting dilution* Ansätze getestet, die sich in der Menge des Ausgangsvolumens, aus dem die in die qPCRs eingesetzten Replikate entnommen wurden, unterschieden.

Zum Nachweis der Sensitivitätsgrenzen wurden in einer ersten Bestimmung *M55/gB* und *pthrp* auf dem TaqMan 7700 quantifiziert. Dazu wurden 5 Ansätze mit synthetischer DNA generiert, in welchen sich der Plasmid-Standard (pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy) mit definierter Teilchenzahl befand. Aus diesen 5 Ansätzen wurden jeweils 12 Aliquots entnommen und quantifiziert, um die Anzahl negativer Ansätze innerhalb der Replikate zu ermitteln.

Zu diesem Zweck wurde der Plasmid-Standard auf 120 Plasmide/ $\mu\text{l}$  eingestellt und  $\log_2$  titriert bis (rechnerisch) 7,5 Plasmide/ $\mu\text{l}$  vorlagen. In jeder Titrationsstufe wurden 2  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA und 10  $\mu\text{l}$  (6  $\mu\text{g}$ ) *Carrier* DNA (Amersham) mit 108  $\mu\text{l}$  TE-Puffer angesetzt, um ein Gesamtvolumen von 120  $\mu\text{l}$  zu erhalten. Davon wurde pro qPCR Ansatz  $1/60$  (2  $\mu\text{l}$ ) des Gesamtvolumens eingesetzt, d.h. es waren pro Ansatz rechnerisch 4 Plasmide, 2 Plasmide, 1 Plasmid, 0,5 Plasmide und 0,25 Plasmide und 100ng *Carrier* DNA in jeder Probe enthalten. Von jeder Titrationsstufe wurden unabhängig voneinander 12 PCR Ansätze pipettiert und im TaqMan 7700 quantifiziert. Nach der Quantifizierung wurde der Anteil der negativen Replikate bestimmt und eine lineare Regression nach der *maximum likelihood* Methode (Fazekas de St. Groth, 1982) kalkuliert.

Die Ergebnisse der *limiting dilution* Ansätze für *M55/gB* und *pthrp* sind in Abb. 3.4 dargestellt. Man sieht, dass beide qPCRs in Bereichen kleiner 5 Kopien, mit *M55/gB*: 2,8 Kopien und einem Konfidenz-Intervall von 1,8 bis 4,4 Kopien und *pthrp*: 3,8 Kopien und einem Konfidenz-Intervall von 1,3 bis 6,3 Kopien, detektieren. Die in den folgenden Kapiteln gezeigten *limiting dilution* Versuche beschränkten sich ausschließlich auf die viralen Gene, da die Menge der zellulären Gene in aufgereinigten DNA Proben nie an der Grenze des Detektionslimits lag.

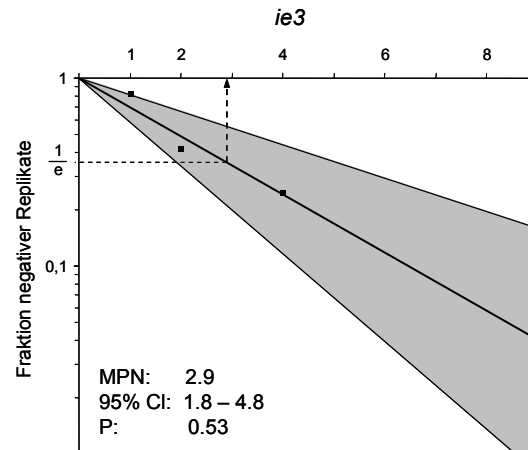




**Abb. 3.4 Sensitivitätsbestimmung der *M55/gB*- und *pthrp*-spezifischen SYBR-Green qPCRs**

Das linearisierte Plasmid pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy wurde titriert und definierte Mengen (240, 120, 60, 30, 15 Plasmide) in die Ausgangsprobe, in welcher sich *Carrier* DNA befand, eingesetzt. Aus jeder dieser Ausgangsproben wurde  $1/60$  Volumen mit jeweils 12 Replikaten pro Titrationsstufe (4, 2, 1, 0,5, 0,25 Plasmide) entnommen und daraus mittels qPCR *M55/gB* und *pthrp* im TaqMan 7700 quantifiziert. Die experimentell bestimmte Anzahl negativer Replikate wurde in die *limiting dilution* Analyse eingesetzt. Daraus wurde die *most probable number* (MPN) errechnet, die Menge an Teilchen, welche vorhanden sein muß, um eine Detektion zu gewährleisten. Das logarithmisch-lineare Diagramm zeigt einen Graphen kalkuliert nach der *maximum likelihood* Methode mit dem entsprechendem 95% Konfidenz-Intervall (grau unterlegt). Basierend auf der Poisson Verteilung wurde die MPN als der Wert ermittelt, welcher den Schnittpunkt zwischen  $1/e$  und der Regressionsgerade bildet (gestrichelte Linie). Für *M55/gB* wurde eine MPN von 2,8 Kopien mit einem 95% Konfidenz-Intervall (CI) von 1,8 bis 4,4, für *ie3* eine MPN von 3,8 Kopien mit einem 95% Konfidenz-Intervall von 1,3 bis 6,6 errechnet. P bezeichnet den Wahrscheinlichkeitswert, welcher ein Maß für die Anpassungsgüte des statistischen Modells ist.

In einem zweiten Ansatz wurde die Detektionsgrenze von *ie3* auf dem TaqMan 7500 bestimmt. Dazu wurde der Plasmid-Standard (pDrive\_IE3\_PTHrP\_Tdy) in nur 40µl Gesamtvolumen  $\log_2$  von 4 bis 0,5 Plasmide/µl titriert und in 12 Replikaten á jeweils 2µl (entspricht 8, 4, 2 Plasmide und 1 Plasmid) direkt in die qPCR eingesetzt. Ebenfalls wurde in die Titrationsreihe eine definierte Menge an *Carrier* DNA eingesetzt, so dass sich in jedem in die PCR eingesetzten Replikate 100ng *Carrier* DNA befanden. Das Ergebnis der qPCR ist in Abb. 3.5 dargestellt. Wie gezeigt, wurden für *ie3* ebenfalls Nachweis-Sensitivitäten kleiner 5 Kopien erreicht. Die MPN lag in diesem Ansatz bei 3 Kopien mit einem 95% Konfidenz-Intervall von 1,8 bis 4,8 Kopien.



### Abb. 3.5 Sensitivitätsbestimmung der *ie3*-spezifischen SYBR-Green qPCRs

Das linearisierte Plasmid pDrive\_IE3\_PTHrP\_Tdy wurde titriert (8, 4, 2 Plasmide, 1 Plasmid) und zu jeweils 12 Replikaten direkt in der *ie3*-spezifischen qPCR im TaqMan 7500 analysiert. Die experimentell bestimmte Anzahl negativer Replikate wurde in die *limiting dilution* Berechnung eingesetzt. Aus diesem Ansatz wurde eine MPN ( $1/e$ ) von 2,9 Kopien errechnet. Zur Berechnung der MPN siehe Abb. 3.4. Das 95% Konfidenz-Intervall von 1,8 bis 4,8 Kopien ist grau unterlegt dargestellt.

Obwohl die Sensitivitätsgrenzen für die Quantifizierungen dreier Gene (*M55/gB*, *ie3* und *pthrp*) unabhängig voneinander auf zwei verschiedenen Geräten ermittelt wurden, gab es trotz der veränderten Parameter keinen Unterschied in den Sensitivitäten für alle getesteten *limiting dilution* Ansätze. Auch die beiden unterschiedlichen Volumina der Ausgangsproben hatten keinen Einfluss auf die Sensitivitätsgrenzen, deshalb wurden alle weiteren Sensitivitätsbestimmungen in dieser Arbeit analog zu Ansatz 2 durchgeführt.

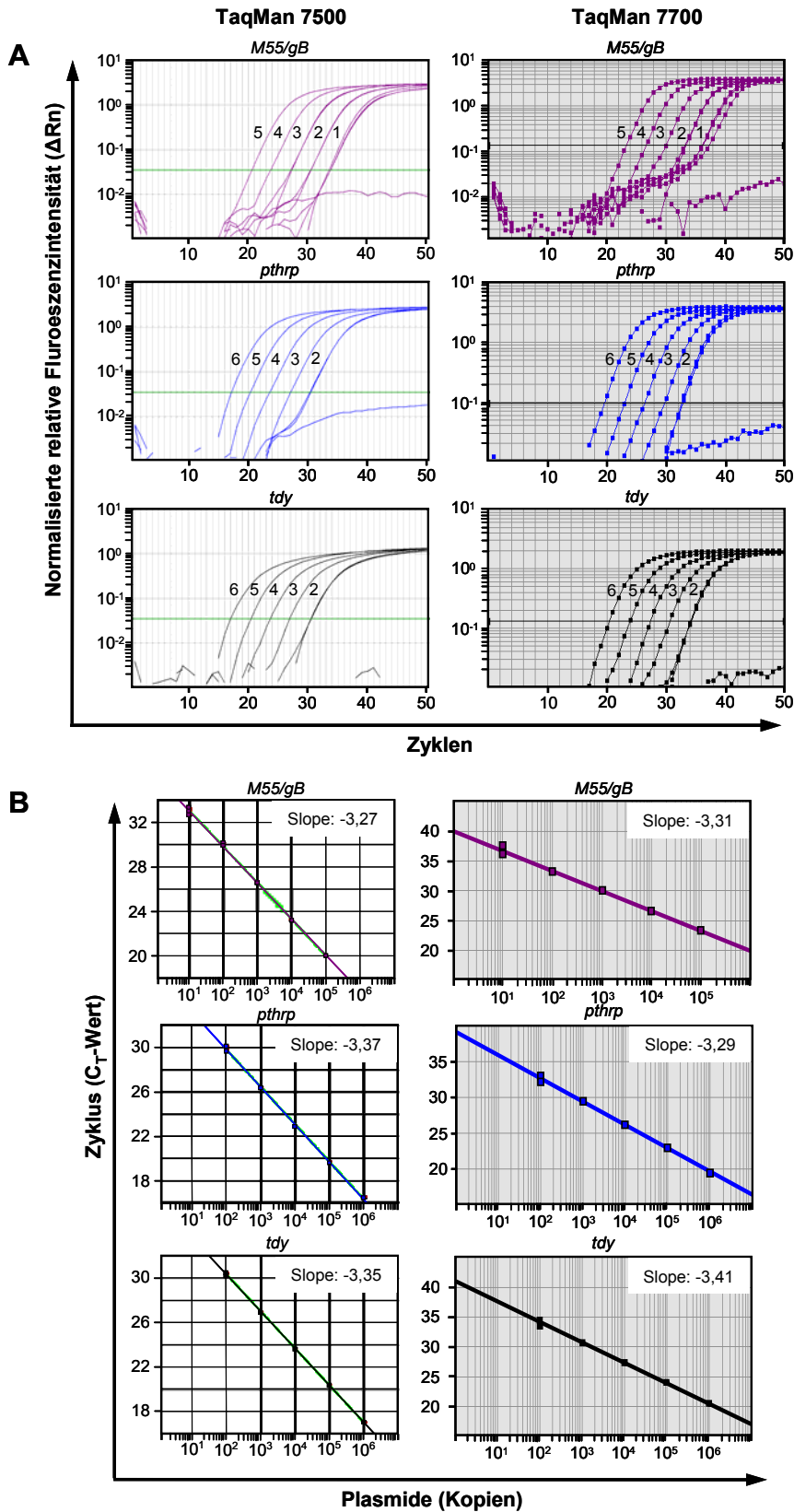
### 3.1.2.3 DNA Quantifizierungen mit TaqMan Sonden

Parallel zu den SYBR-Green DNA Quantifizierungen wurden Quantifizierungen mit TaqMan Sonden etabliert. Es wurden drei qPCRs (*M55/gB*, *pthrp* und *tdy*) sowohl für den TaqMan 7700 als auch für den TaqMan 7500 optimiert (2.10.14.2.3). Aus den unter 2.9.1.3 und 2.9.1.4 beschriebenen Primerpaaren und Sonden erwiesen sich folgende Primer- und Sondenkombinationen als optimal: gB\_Taq\_For1/Rev1 mit gB\_Taq\_P1 Sonde für *M55/gB*, PTHrP\_Taq\_For1/Rev1 mit PTHrP\_Taq\_P1 Sonde für *pthrp* und Tdy\_Taq\_For1/Rev1 mit Tdy\_Taq\_P1 Sonde für *tdy*. Die Amplifikationsprofile der jeweiligen Genbereiche aus dem Plasmid-Standard sind in Abb. 3.6A und die korrespondierenden Standardkurven in Abb. 3.6B dargestellt. Die aus Abb.3.6B errechnete Amplifikationseffizienz betrug auf dem TaqMan 7500 für *M55/gB* 102,2%, für *pthrp* 98,0% und für *tdy* 98,8%. Für den TaqMan 7700 betrug die Effizienz für *M55/gB* 100,5%, für *pthrp* 101,3% und für *tdy* 96,5%. Auch hier war deutlich zu sehen, dass die Abweichungen der Amplifikationseffizienzen ( $\Delta E$ ) für alle getesteten Gene auf beiden Geräten unter 5% lagen.

Interessanterweise lag der so genannte *y-Intercept*, d.h. der *y*-Schnittpunkt der Standardkurve, bei SYBR-Green Quantifizierungen immer bei einer niedrigeren Zyklenzahl als bei Quantifizierungen mit TaqMan Sonden. Dies wurde deutlich, wenn aus einer Titrationsreihe sowohl eine Quantifizierung mit SYBR-Green als auch eine Quantifizierung mit TaqMan Sonden durchgeführt wurde. Normalerweise lag der *y*-Schnittpunkt bei SYBR-Green Quantifizierungen zwischen Zyklus 34 und 37, bei Quantifizierungen mit TaqMan

---

Sonden zwischen Zyklus 38 und 41. Diese Diskrepanz ist eventuell auf eine Verstärkung der Fluoreszenzemission der interkalierten SYBR-Green Moleküle zurückzuführen, da sich in die jeweiligen Amplifikate mehrere SYBR-Green Moleküle einlagern können. Allerdings wirkten sich solche Unterschiede in der Zyklenzahl nicht auf die Ergebnisse der Quantifizierungen aus, da bei SYBR-Green Quantifizierungen nicht nur die Standards, sondern auch die Proben früher ansteigen und das Verhältnis somit gleich blieb.

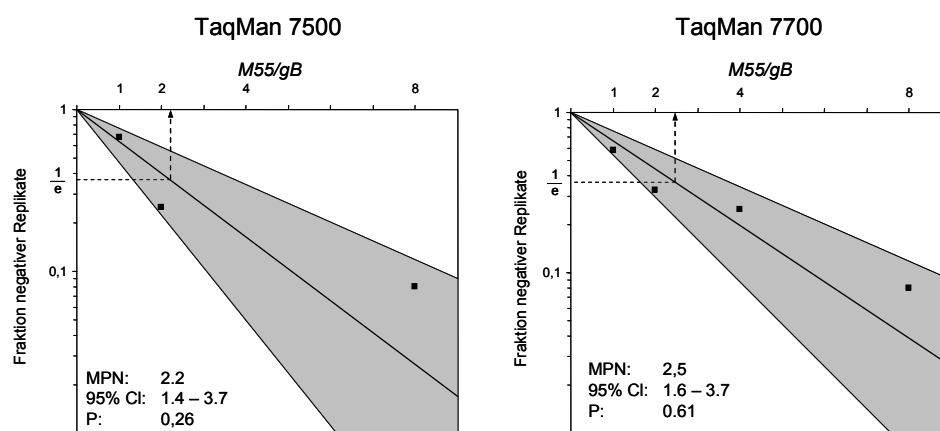


**Abb. 3.6 Ermittlung optimaler qPCR Bedingungen mit TaqMan Sonden**

A: Amplifikationsprofile des mit *Sma* I linearisierten Plasmids pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy auf dem TaqMan 7500 (linke Spalte) und dem TaqMan 7700 (rechte Spalte) für *M55/gB* (violett,  $10^5$  bis  $10^1$  Kopien, markiert durch Exponenten), *pthrp* (blau,  $10^6$  bis  $10^2$  Kopien) und *tdy* (schwarz,  $10^6$  bis  $10^2$  Kopien). Alle Titrations von  $10^6$  bis  $10^3$  Plasmide wurden einzeln, die Titrations für  $10^2$  Plasmide als Duplikate und die Titrations für  $10^1$  Plasmide als Triplikate quantifiziert. Auf der y-Achse ist die normalisierte relative Fluoreszenzintensität ( $R_n$ ) aufgetragen, bei welcher die Fluoreszenz des

Reporters durch die Fluoreszenz des passiven Referenzfarbstoffs (ROX) dividiert wird. Der  $\Delta R_n$  Wert bezeichnet die normalisierte relative Fluoreszenzintensität abzüglich des Hintergrundrauschens (*baseline*). Die horizontale Linie (links grün und rechts schwarz dargestellt) kennzeichnet den jeweiligen *threshold*, welcher die  $C_T$ -Werte definiert. B: Die Auftragung der jeweiligen  $C_T$ -Werte gegen die korrespondierende Kopienzahl des Plasmid-Standards führte zu den entsprechenden *M55/gB*, *pthr* und *tdy* Standardkurven. Zur Berechnung der Effizienzen (*slope*) siehe Text.

Nachdem die qPCRs mit TaqMan Sonden erfolgreich etabliert waren, wurde die Detektionsgrenze für *M55/gB* analog zu Ansatz 2 in 3.1.2.2 auf beiden TaqMan Geräten bestimmt. Die Nachweis-Sensitivität für *M55/gB* war, wie in Abb. 3.7 dargestellt, auf beiden Geräten gleich, was sehr deutlich an der fast identischen MPN mit 2,2 Teilchen und einem Konfidenz-Intervall von 1,4 bis 3,7 Teilchen auf dem TaqMan 7500 und 2,5 Teilchen mit einem Konfidenz-Intervall von 1,6 bis 3,7 Teilchen auf dem TaqMan 7700 zu sehen ist.



**Abb. 3.7 Sensitivitätsbestimmung der *M55/gB* spezifischen qPCRs auf TaqMan 7500 und 7700**

Das linearisierte Plasmid pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy wurde titriert (8, 4, 2 Plasmide, 1 Plasmid) und zu jeweils 12 Replikaten in einer *M55/gB*-spezifischen qPCR quantifiziert. Die experimentell bestimmte Anzahl negativer Replikate wurde in die *limiting dilution* Berechnung eingesetzt. Für den TaqMan 7500 ergab sich eine MPN von 2,2 Teilchen, für den TaqMan 7700 eine MPN von 2,5 Teilchen. Zur Berechnung der MPN siehe Abb. 3.4. Das 95% Konfidenz-Intervall, welches für den TaqMan 7500 zwischen 1,4 und 3,7 Kopien und für den TaqMan 7700 zwischen 1,6 und 3,7 Kopien lag, ist grau unterlegt dargestellt.

### 3.1.2.4 Überprüfung des Plasmid-Standards

Nach der Ermittlung der Detektionsgrenze für *M55/gB* wurde der Plasmid-Standard auf die Richtigkeit der zuvor eingestellten Teilchenzahl getestet, da bei absoluten Quantifizierungen die Ergebnisse in erster Linie von der Genauigkeit des eingesetzten Plasmid-Standards abhängig sind. So ergeben beispielsweise zu hoch definierte Standards vermeintlich unterschätzte, und zu niedrig definierte vermeintlich überschätzte Kopienzahlen.

Die Berechnung, die der Ermittlung der Teilchenzahl zugrunde liegt, ist in Kapitel 2.10.14.2.1 beschrieben. Die Genauigkeit des Standards kann überprüft werden, indem die eingesetzte DNA Menge der unbekannt Probe auf die Zellzahl hochgerechnet wird. Wenn sich in einer Zelle näherungsweise 6pg DNA befinden, so sind dies auf  $1 \times 10^6$  Zellen hochgerechnet 6µg DNA. Quantifizierungen mit *pthr* ergeben durch 2 dividiert – da *pthr* ein zelluläres *single-copy* Gen ist, welches im diploiden Chromosomensatz zweimal vorliegt – die Anzahl der pro

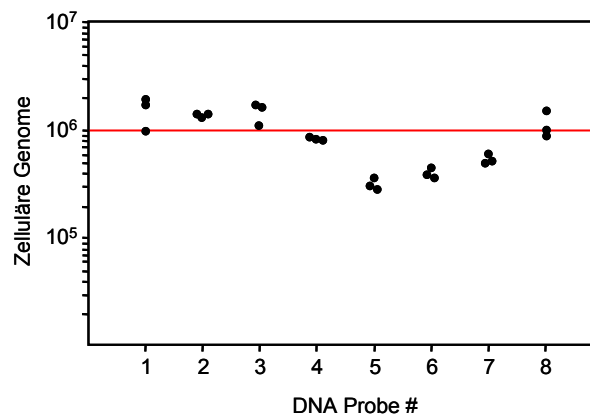
Probe eingesetzten Zellen. Verrechnet man diesen Wert mit der eingesetzten Menge an DNA, so kann man anhand des Ergebnisses die Genauigkeit des Standards abschätzen. Die Berechnung ist in folgender Formel dargestellt:

$$ZZ = \frac{6\mu\text{g DNA}}{x\mu\text{g DNA}} \times \left( \frac{\text{pthrp}}{2} \right)$$

ZZ= Zellzahl ( $1 \times 10^6$  Zellen)

x= eingesetzte DNA Menge [ $\mu\text{g}$ ]

Zur Überprüfung des Plasmid-Standards wurde aus acht Lebergewebeproben DNA aufgereinigt (2.10.1.2), die DNA Konzentration bestimmt (2.10.3) und definierte Mengen DNA in eine *pthrp*-spezifische qPCR eingesetzt. Somit konnte die Anzahl der Genome pro Probe quantifiziert werden. Die Ergebnisse der Quantifizierung sind auf  $6\mu\text{g}$  DNA hochgerechnet in Abb. 3.8 dargestellt.



**Abb. 3.8 Überprüfung der Teilchen-Genauigkeit des Plasmid-Standards pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy**  
Mit Leberzell-DNA aus acht unterschiedlichen Aufreinigungen (DNA Proben 1-8) als *template* erfolgten *pthrp*-spezifische qPCRs sowohl mit SYBR-Green als auch mit TaqMan Sonden. Als Standard wurde das Plasmid pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy eingesetzt. Da  $6\mu\text{g}$  DNA einer Menge von ungefähr  $1 \times 10^6$  Zellen entspricht, wurden zur Berechnung  $6\mu\text{g}$  DNA durch die in die Quantifizierung eingesetzte DNA Menge geteilt und das Ergebnis mit der Anzahl der quantifizierten Zellen ( $\text{pthrp}/2$ ) multipliziert (Formel siehe Text). Alle Proben wurden als Triplikate in drei unabhängigen Quantifizierungen gemessen und die jeweiligen Mittelwerte in die Abbildung eingetragen. Die rote Linie stellt die theoretische Menge zellulärer Genome für  $6\mu\text{g}$  DNA dar.

Wie in Abb. 3.8 deutlich zu erkennen, streuen alle errechneten Werte der Proben um den erwarteten Wert von  $1 \times 10^6$  Zellen mit einer maximalen Abweichung um den Faktor 3 (min. Wert:  $3 \times 10^5$  Zellen, max. Wert:  $2 \times 10^6$  Zellen). Da diese Berechnungen durch mehrere Einflüsse, wie z.B. der eingesetzten DNA Menge oder der eingestellten Teilchenzahl des Plasmid-Standards beeinflusst werden konnten, bewegten sich diese Schwankungen in einem sehr akzeptablen Bereich.

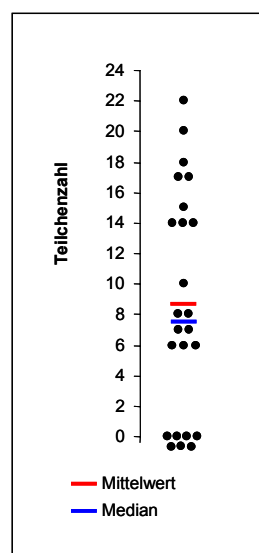
Alle DNA Quantifizierungen in dieser Arbeit waren absolut. Dabei ist zu beachten, dass leichte Schwankungen der eingestellten Standards zu vernachlässigen sind, da die Standards aller Gene, die quantifiziert wurden, auf einem Plasmid lagen. Die so erhaltenen Daten wurden anschließend zueinander ins Verhältnis gesetzt, d.h. eventuell auftretende Schwankungen betrafen somit alle Quantifizierungen. So wurden beispielsweise in einem

Ansatz, in welchem zu viele zelluläre Genome quantifiziert wurden, gleichzeitig auch zu viele virale Genome quantifiziert, was sich dann wiederum relativiert.

### 3.1.2.5 Einfluss niedriger Teilchenzahlen auf die qPCR

Wie bereits in 3.1.2.2 und 3.1.2.3 gezeigt werden konnte, wurde eine Nachweis-Sensitivität von mindestens 3 Kopien des *ie3* Plasmid-Standards und von mindestens 2 Kopien des *M55/gB* Plasmid-Standards erzielt. Es sollte nun untersucht werden, in welchem Bereich sich die Varianz der DNA Quantifizierung bei einer definierten Anzahl eingesetzter Plasmide bewegt. Das Problem einer exakten Quantifizierung stellte sich vor allem dann, wenn Proben mit geringer Teilchenzahl eingesetzt wurden, da in diesem Fall die Varianzen der Replikate einer Probe mit abnehmender Teilchenmenge immer größer wurden.

Um zu determinieren, wie groß die Schwankungen bei einer definierten Anzahl eingesetzter Teilchen waren, wurde der Plasmid-Standard auf 5 Plasmide pro Ansatz titriert und mit insgesamt 24 Replikaten in die eine *M55/gB*-spezifische qPCR eingesetzt. Die Menge der eingesetzten Plasmide wurde absolut mit einer *M55/gB*-spezifischen Sonde quantifiziert (Abb. 3.9). Wie in der Abb. 3.9 dargestellt, gab es deutliche Schwankungen in der Quantifizierung mit einer Varianz zwischen 0 und 22 quantifizierten Teilchen. Die Berechnungen der eingesetzten Replikate ergaben als Median 7,5 Plasmide und als Mittelwert 8,7 Plasmide. Dies stellt für die ursprünglich 5 eingesetzten Plasmide ein sehr gutes Ergebnis dar. Da die Verteilung der Quantifizierung bei geringer Teilchenzahl, wie hier zu sehen, sehr heterogen war, wurden bei jeder der folgenden Quantifizierungen viraler Genome 3 Replikate getestet und diese, je nach DNA Ausbeute, jeweils in ein bis drei unabhängigen TaqMan Analysen quantifiziert.

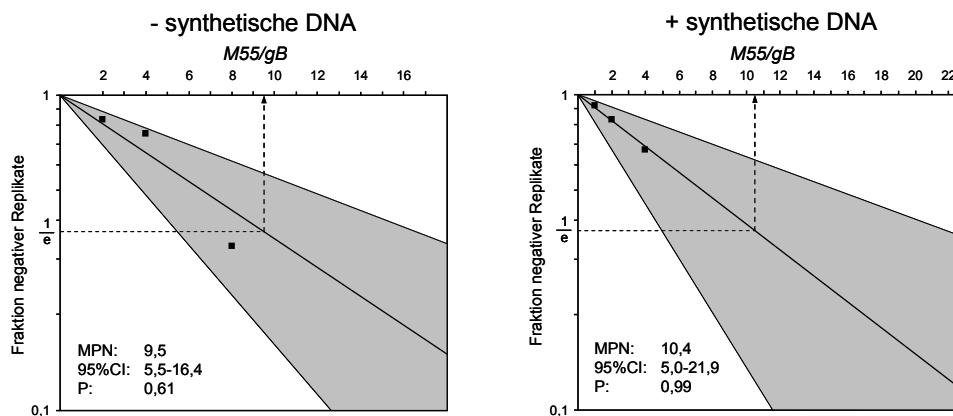


#### Abb. 3.9 Streuung der qPCRs in Ansätzen mit geringer Ausgangsmenge an Amplikon

Jeweils 5 Teilchen des Plasmids pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy wurden in eine *M55/gB*-spezifische qPCR eingesetzt und quantifiziert. Das Plasmid pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy diente als Standard. Die Ergebnisse der absoluten Quantifizierungen der jeweiligen Teilchenzahlen sind im Diagramm dargestellt. Insgesamt wurden 24 Replikate getestet und aus den Ergebnissen der absoluten Quantifizierung der Mittelwert (rot) und der Median (blau) berechnet. Alle Ansätze, die nach 50 PCR Zyklen negativ blieben, sind mit 0 vermerkt.

### 3.1.2.6 Einfluss der DNA Konzentration auf die Sensitivität der qPCR

Da in einzelnen Versuchen unterschiedliche Mengen an DNA eluiert wurden und nicht immer die gleiche DNA Konzentration in die qPCR eingesetzt werden konnte, wurde überprüft, ob unterschiedliche Mengen an eingesetzter DNA die Sensitivität der qPCR verändern können. Dies wurde ebenfalls mit einem *limiting dilution* Ansatz überprüft. Dazu wurde das Plasmid pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy log<sub>2</sub> titriert und jeweils 8, 4, 2 Plasmide und 1 Plasmid in eine *M55/gB*-spezifische qPCR eingesetzt. Es wurden 12 Replikate pro Titrationsstufe angesetzt und jedes Replikat sowohl einmal mit zusätzlicher DNA (500ng (Poly(dA-dT) DNA, Amersham) pro Ansatz als auch einmal ohne zusätzliche DNA versetzt. Wie in Abb. 3.10 eindeutig zu sehen ist, haben unterschiedliche DNA Konzentrationen keinen Einfluss auf die Sensitivität der qPCR, da die MPN ohne zusätzliche DNA bei 9,5 Teilchen mit einem Konfidenz-Intervall von 5,5 bis 16,4 Teilchen und mit 500ng zusätzlicher DNA bei 10,4 Teilchen mit einem Konfidenz-Intervall von 5,0 bis 21,9 Teilchen lag.



**Abb. 3.10 Sensitivität der qPCR mit und ohne zusätzlicher DNA**

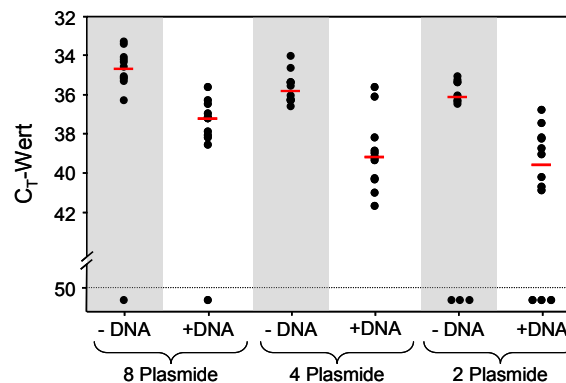
Das titrierte Plasmid pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy (8, 4, 2 Plasmide und 1 Plasmid) wurde mit jeweils 12 Replikaten in einer *M55/gB*-spezifischen qPCR mittels TaqMan Sonden quantifiziert. Die experimentell bestimmte Anzahl negativer Replikate wurde in die *limiting dilution* Berechnung eingesetzt. Für den Ansatz ohne synthetische DNA wurde eine MPN von 9,5 Teilchen, für den Ansatz mit synthetischer DNA eine MPN von 10,4 Teilchen ermittelt. Zur Berechnung der MPN siehe Abb. 3.4. Das 95% Konfidenz-Intervall ist grau unterlegt dargestellt.

### 3.1.2.7 Einfluss der DNA Konzentration auf den C<sub>T</sub>-Wert der qPCR

Nachdem ausgeschlossen werden konnte, dass unterschiedliche Mengen eingesetzter DNA die Sensitivität der qPCR beeinflussen, wurde getestet, ob eine hohe eingesetzte DNA Konzentration eine Verschiebung der C<sub>T</sub>-Werte bewirkt. Dazu wurde das Plasmid pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy log<sub>2</sub> titriert und 8, 4 und 2 Plasmide zu jeweils 12 Replikaten in eine *M55/gB*-spezifische qPCR eingesetzt, einmal mit und einmal ohne zusätzliche synthetische DNA (750ng) pro qPCR Ansatz. Das Ergebnis der Quantifizierung ist in Abb. 3.11 dargestellt. Ein Vergleich der Mediane der C<sub>T</sub>-Werte der einzelnen Titrationsstufen ergab folgende Werte: 8 Plasmide: ohne synthetische DNA 34,8 und mit synthetischer DNA 37,2 ( $\Delta C_T$ : 2,4) 4 Plasmide: ohne synthetische DNA 35,8 und mit synthetischer DNA 39,2 ( $\Delta C_T$ : 3,4), 2 Plasmide: ohne synthetische DNA 36,2 und mit synthetischer DNA 39,6 ( $\Delta C_T$ : 3,4). Damit war deutlich zu erkennen, dass eine hohe DNA Konzentration eine Verschiebung der C<sub>T</sub>-



Werte um 3 bis 4 Zyklen in den höheren Bereich bewirkt. Da jedoch alle viralen Quantifizierungen in dieser Arbeit auf zelluläre Gene normalisiert wurden, hatten Erhöhungen, bzw. Erniedrigungen der  $C_T$ -Werte aufgrund unterschiedlicher DNA Konzentrationen keinen Einfluss auf das Ergebnis der Quantifizierung. Durch diesen Versuch konnte das unter 3.1.2.6 erhaltene Ergebnis, dass die Sensitivität der qPCR bei einer hohen eingesetzten DNA Konzentration nicht abnimmt, noch einmal bestätigt werden. In Abb. 3.11 ist deutlich zu erkennen, dass sich die Anzahl negativer Replikate in den Ansätzen mit und ohne zusätzliche synthetische DNA nicht unterscheidet und die Sensitivität der qPCR somit gleich bleibt.



**Abb. 3.11 Verschiebungen der  $C_T$ -Werte der qPCR mit und ohne zusätzlicher DNA**

Das titrierte Plasmid pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy (8, 4, 2 Plasmide) wurde mit jeweils 12 Replikaten in eine *M55/gB*-spezifische qPCR eingesetzt und die  $C_T$ -Werte analysiert. Zu jedem Ansatz einer Titrationsreihe wurden 750ng synthetische DNA (+DNA) gegeben, wobei die andere Titrationsreihe ohne zusätzliche synthetische DNA (-DNA, grau unterlegt) gemessen wurde. Dargestellt sind die  $C_T$ -Werte aller quantifizierten Ansätze (schwarz), wobei alle negativen Ansätze unterhalb des *cutoff* von 50 Zyklen liegen. In den Ansätzen ist der jeweilige Median der quantifizierten Werte rot eingezeichnet.

#### Zusammenfassung:

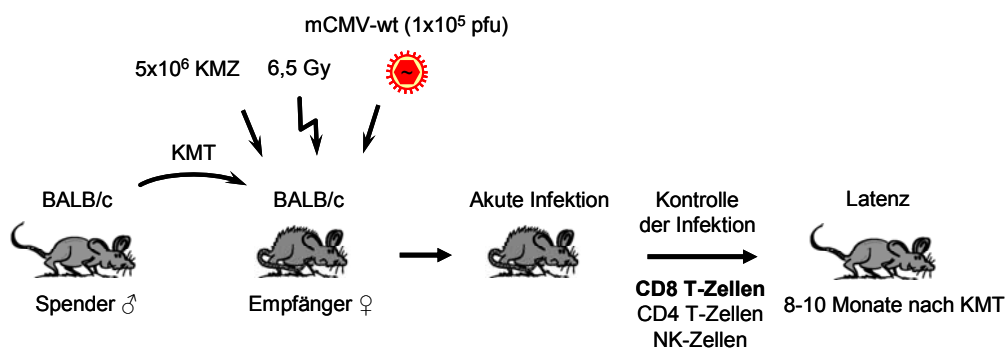
Durch erfolgreiche Etablierung quantitativer PCRs können virale und zelluläre Genome und y-chromosomale Gene sowohl mittels TaqMan als auch mittels LightCycler Analysen absolut quantifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität der DNA Quantifizierung von der verwendeten Reporterfluoreszenz (SYBR-Green oder TaqMan Sonden) und der eingesetzten DNA Konzentration unabhängig ist. Sowohl für *ie3*, *M55/gB* als auch *pthrp* konnte eine Nachweisgrenze von 2 bis 3 Kopien erzielt werden.

## 3.2 Kinetik viraler DNA Load nach KMT

Nachdem alle für diese Arbeit relevanten qPCRs erfolgreich etabliert wurden, konnten diese zur Identifizierung und Quantifizierung latenter viraler DNA aus Organen und Geweben eingesetzt werden. Da alle nachfolgenden Untersuchungen zur mCMV Latenz an latent infizierten Mäusen durchgeführt wurden, erfolgte zuerst die Etablierung der Viruslatenz in den Tieren. Dazu wurden getrenntgeschlechtliche KMTs (Abb. 3.12) mit männlichen BALB/c Mäusen als Spender und weiblichen Mäusen als Empfänger (2.4.3) durchgeführt (Steffens et al., 1998b). Die Empfänger wurden zuerst durch Bestrahlung immunsupprimiert und erhielten anschließend Knochenmark zur Rekonstitution des Immunsystems. Danach erfolgte die

mCMV Infektion. Dieses KMT-Modell dient dazu, durch die temporäre Immunsuppression eine außergewöhnlich hohe virale DNA *Load* zu erreichen, wodurch es möglich ist, latentes Virus in unterschiedlichen Organen und Geweben zu detektieren.

Ungefähr 3 Wochen nach KMT erreicht die akute Phase der Infektion ihren Höhepunkt; danach erfolgt die Kontrolle der produktiven Infektion vornehmlich durch rekonstituierte, die Gewebe infiltrierende, antivirale CD8 T-Zellen (Holtappels et al., 1998; Steffens et al., 1998a; Holtappels et al., 2000; Podlech et al., 2000), aber auch durch CD4 T-Zellen und NK-Zellen, und schließlich wird Latenz etabliert. Zu frühen Zeitpunkten der mCMV-Viruslatenz können zwei Phasen unterschieden werden: eine transiente *Hämatopoetische Latenz* in Zellen der myelomonozytischen Differenzierungslinie und eine *Permanente* (lebenslange) *Latenz* in stromalen oder parenchymalen Zellen multipler Organe (Übersicht: Reddehase et al., 2002). Da die Untersuchungen der Viruslatenz in stromal-parenchymalen Kompartimenten der Leber und nicht im hämatopoetischen System vorgenommen werden sollten, war eine vollkommene Abwesenheit der transienten *Hämatopoetischen Latenz* eine grundlegende Voraussetzung für diese Analysen. Aufgrund dessen wurden alle Mäuse erst 8 bis 10 Monate nach KMT für nachfolgende Experimente verwendet.

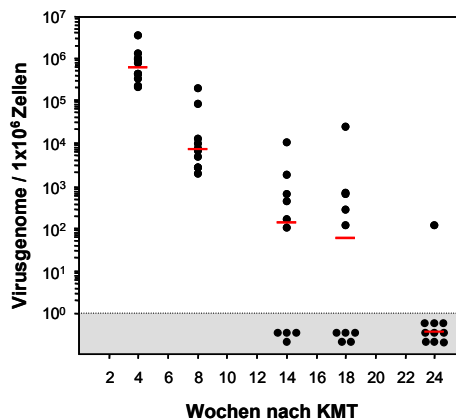


### Abb. 3.12 KMT-Modell zur Etablierung von mCMV Latenz

Weibliche BALB/cJ Mäuse erhielten zur hämatoablativen Konditionierung eine Ganzkörperbestrahlung mit einer Dosis von 6,5 Gray. Nach Bestrahlung wurden 5x10<sup>6</sup> Knochenmarkszellen aus männlichen Spendern in die weiblichen Empfänger transplantiert und die Tiere mit einer Dosis von 1x10<sup>5</sup> PFU mCMV-wt infiziert. Zur akuten Infektion und der Ausbildung von Latenz siehe Text.

Akute Infektionen sind assoziiert mit einer hohen viralen DNA *Load* in Monozyten und polymorphkernigen Leukozyten im Blut (Mitchell et al., 1996). Diese virale DNA wird aus produktiv infizierten Zellen verschiedener Organe aufgenommen. Davon können allerdings hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen ausgenommen werden, da gezeigt wurde, dass die *Clearance* viraler DNA im KM der *Clearance* viraler DNA im Blut vorausgeht (Balthesen et al., 1994b; Reddehase et al., 1994; Kurz et al., 1999). Somit ist die vollständige Abwesenheit viraler DNA aus dem Blut ein Beweis für die Etablierung von Latenz im ganzen Organismus. Der Beweis, dass die virale DNA *Load* im Blut stetig abnimmt und nach ungefähr 8 Monaten nahezu vollständig entfernt ist, wurde bereits in früheren Arbeiten mittels *ie1*-spezifischer PCR und anschließendem Southern Blot erbracht (Kurz et al., 1997; Kurz et al., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurde in einer Kinetik die Abnahme der viralen DNA *Load* im Blut mittels qPCR bestimmt und mit den Daten von Kurz et al. (1999) verglichen.

In Abb. 3.13 ist die Quantifizierung viraler Genome aus Mäuseblut zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach KMT dargestellt. Dazu wurden 10 Tieren, die zufällig aus der Gesamtheit der transplantierten Tiere einer KMT gewählt wurden, pro Zeitpunkt (4, 8, 14, 18 und 24 Wochen nach KMT) aus der Schwanzvene Blut entnommen (2.4.4) und die DNA aufgearbeitet (2.10.1.3). Diese wurde anschließend in eine *ie3*- und *pthrp*-spezifische qPCR eingesetzt um die virale DNA *Load* zu quantifizieren. Eine Abnahme der viralen DNA *Load* im Zeitverlauf ist in Abb. 3.13 sehr deutlich zu erkennen. Damit konnten die früheren Ergebnisse, in welchen ebenfalls nach 6 bis 8 Monaten keine oder nur noch sehr geringe Mengen viraler DNA im Blut nachgewiesen wurden, bestätigt werden, was für eine absolute Vergleichbarkeit von qPCR und PCR mit anschließendem Southern Blot spricht.



#### Abb. 3.13 Kinetik der viralen DNA *Load* im Blut nach KMT

Zu den angegebenen Zeitpunkten nach KMT wurde Blut aus der Schwanzvene von jeweils 10 zufällig gewählten Mäusen einer KMT entnommen und die DNA isoliert. Diese wurde anschließend in eine *ie3*- und *pthrp*-spezifische qPCR mit dem Plasmid pDrive\_IE3\_PTHrP\_Tdy als Standard eingesetzt. Gezeigt ist die virale DNA *Load* für jedes einzelne Tier auf  $1 \times 10^6$  Zellen normiert. Die Mediane der jeweiligen Zeitpunkte sind rot eingezeichnet. Hellgrau unterlegt sind alle Proben, in welchen nach 50 PCR Zyklen keine virale DNA detektierbar war.

#### Zusammenfassung:

Nach getrenntgeschlechtlichen KMTs aus männlichen Spendern in weibliche Empfänger mit anschließender mCMV Infektion ist die virale DNA im Blut nach 6 bis 8 Monaten vollständig entfernt. Alle Latenzuntersuchungen wurden aufgrund dessen frühestens 6 Monate nach KMT durchgeführt.

### 3.3 mCMV Reaktivierung aus Organexplantaten

Nach KMT und Etablierung von Latenz wurden die Organe, insbesondere die Leber, auf Präsenz viraler Genome untersucht. Die Leber ist ein Organ, in welchem latente mCMV DNA mittels PCR (Collins et al., 1993; Koffron et al., 1998) oder PCR *in situ* Hybridisierung (Koffron et al., 1998) nachweisbar ist. Um den Nachweis latenter mCMV DNA in der Leber zu bestätigen, wurden in einem ersten Experiment (3.3.1) Versuche zur Detektion und Quantifizierung viraler DNA mittels qPCR aus der gesamten Leber latent infizierter Mäuse durchgeführt.

Die mCMV Reaktivierung wurde in früheren Arbeiten nicht nur durch den Einsatz von Immunsuppressiva (Bevan et al., 1996; Shanley et al., 1979) sondern auch ohne zusätzliche Immunsuppression aus Organexplantaten von Milz (Jordan & Mar, 1982; Pollock & Virgin IV, 1995), Niere (Porter et al., 1985; Pollock & Virgin IV, 1995) und Lunge (Presti et al., 1998) nachgewiesen. Dazu wurden die Organe in kleine Stücke zerteilt oder homogenisiert und in Medium kultiviert. Anschließend wurden die Stücke oder Homogenate, bzw. Überstände der Kulturen, auf MEF zum Nachweis einer produktiven Infektion im Plaqueassay gegeben. Diese Ansätze zur Reaktivierung aus Organexplantaten werden im zweiten Experiment (3.3.2) auf die Leber übertragen, um den Beweis zu erbringen, dass in der Leber nachweisbare virale DNA ohne zusätzliche Immunsuppression wieder reaktivieren kann.

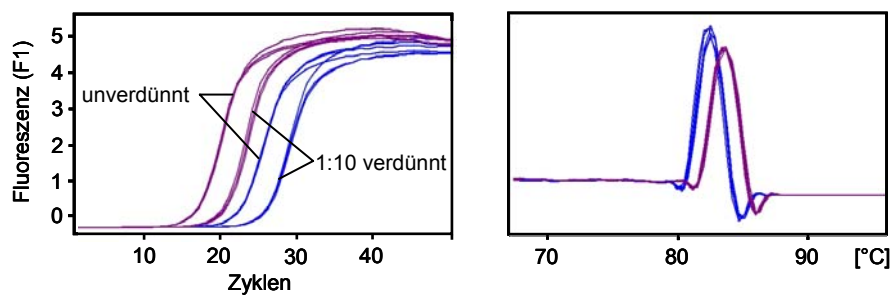
### 3.3.1 Latente virale DNA Load in der Leber

Bisherige Analysen der viralen DNA *Load* in Organen latent infizierter Tiere beschränkten sich hauptsächlich auf die Lunge, in welcher eine virale DNA Load zwischen  $2 \times 10^3$  bis  $9 \times 10^3$  Kopien pro  $1 \times 10^6$  Lungenzellen quantifiziert wurde (Kurz et al., 1999; Grzimek et al., 2001; Simon et al., 2005). Bei akuten Infektionen konnten neben der Lunge und anderen Organen auch in der Leber sehr viele infizierte Foci nachgewiesen werden (Ruebner et al., 1964; Henson et al., 1966), wobei vor allem die Hepatozyten einen Ort der Virusreplikation darstellten. Da allerdings nicht davon ausgegangen werden kann, dass die virale DNA *Load* der einzelnen Organe in der Latenz mit der Virusmenge im jeweiligen Organ während der akuten Infektion korreliert (Balthesen et al., 1994a; Reddehase et al., 1994), wurde die virale DNA *Load* latent infizierter Tiere in der Leber überprüft.

Zur Quantifizierung der viralen DNA *Load* wurden zunächst zwei unterschiedliche Methoden der DNA Aufreinigung getestet, zum einen die Aufreinigung mit dem DNeasy Kit (QIAGEN) und zum anderen die Aufreinigung mittels Phenol-Chloroform. Die Leber wurde dazu aseptisch entnommen und in der Mixer-Mill (2.10.1.1) homogenisiert; anschließend wurde eine definierte Menge entweder in die DNA Aufreinigung mit dem DNeasy Kit (QIAGEN) eingesetzt (2.10.1.2) oder DNA aus der gesamten Menge an Leberhomogenat mittels Phenol-Chloroform Aufreinigung isoliert. Im Anschluss an die Phenol-Chloroform Aufreinigung erfolgte noch eine Aufreinigung über eine Silica Säule (2.10.1.5). Vergleiche der DNA Aufreinigungsmethoden zeigten, dass es keinen Unterschied sowohl in der Reinheit der DNA als auch in den PCR Effizienzen der nachfolgenden qPCRs zwischen den unterschiedlichen Aufreinigungsmethoden gibt (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde DNA aus Lebergewebe, bzw. aus Leberzellen fortan standardmäßig über DNeasy Säulen und nicht Phenol-Chloroform aufgereinigt.

Nach den Untersuchungen zur optimalen DNA Aufreinigung wurde getestet, ob die qPCR durch eventuell noch vorhandenes Heparin aus der Leber inhibiert wird (Beutler et al., 1990; Izraeli et al., 1991). Dazu wurde Leber DNA definierter Menge aus akut infizierten und immunsupprimierten Mäusen mit oder ohne Heparinase II behandelt und anschließend in die qPCR eingesetzt. In Abb. 3.14 sind Quantifizierungen mit jeweils gleicher DNA Ausgangsmenge dargestellt, welche entweder unbehandelt, nach Inkubation mit 2,5U Heparinase pro  $\mu\text{g}$  DNA oder aber nach Inkubation mit 2,5U Heparinase pro  $\mu\text{g}$  DNA und anschließender Hitzeinaktivierung eingesetzt wurden. Die Heparinase wurde im Überschuss

eingesetzt um eine effiziente Eliminierung von eventuell vorhandenem Heparin zu gewährleisten. Ausreichend für 1µg DNA ist normalerweise 1U Heparinase (Taylor, 1997), wobei höhere Konzentrationen keinen negativen Effekt auf die nachfolgenden Applikationen haben (Izraeli et al., 1991). Es ist deutlich zu erkennen, dass die Quantifizierung sowohl für *M55/gB* als auch für *pthrp* unabhängig von eventuell vorhandenem Heparin in allen drei Ansätzen gleich ist. Dies bedeutet, dass eventuell vorhandenes Heparin keinen inhibitorischen Effekt auf die qPCR hat. Demzufolge ist eine vorherige Heparinase Behandlung der DNA nicht nötig und wurde somit für qPCRs der Leber DNA nicht angewendet.

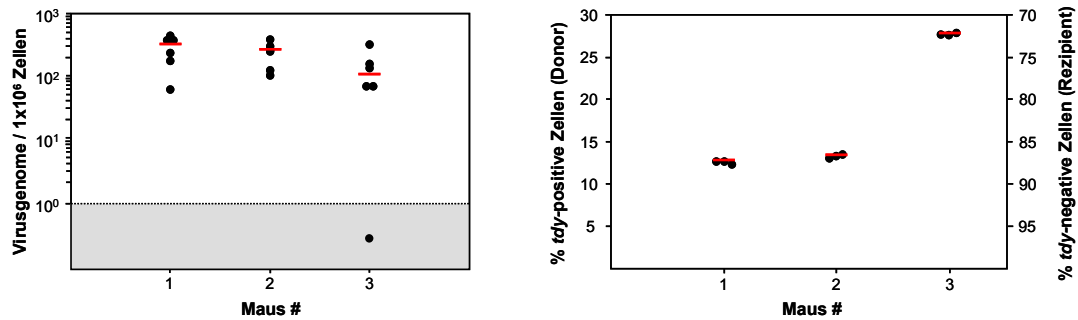


#### Abb. 3.14 Putativer Einfluss von Heparin auf die qPCR

Aus gesamter Leber isolierte DNA wurde entweder unbehandelt, mit Heparinase behandelt, oder mit Heparinase behandelt und anschließend hitzeinaktiviert, in eine *M55/gB*- (violett) und *pthrp*- (blau) spezifische qPCR eingesetzt. Alle Proben wurden jeweils unverdünnt und 1:10 verdünnt quantifiziert. In der linken Abbildung sind die Amplifikationskurven, in der rechten Abbildung die Schmelzkurven der jeweiligen Ansätze dargestellt. Aufgrund der gleichmäßigen Anstiege der Amplifikationskurven erfolgte aus Gründen der Übersichtlichkeit keine Diskriminierung der einzelnen Kurven durch Beschriftung oder farbliche Kennzeichnung.

Zur Quantifizierung der viralen DNA *Load* aus latent infizierten Tieren und des Anteils der vom KM-Spender abstammenden *tdy*-positiven Zellen wurde aus drei Mäusen die Leber entnommen, daraus separat DNA isoliert und jeweils in eine *M55/gB*-, *pthrp*- und *tdy*-spezifische qPCR eingesetzt. In Abb. 3.15 ist klar zu erkennen, dass die virale DNA *Load* der Leber mit maximal  $5 \times 10^2$  Virusgenomen pro  $1 \times 10^6$  Zellen in allen Ansätzen deutlich niedriger war als die virale DNA *Load* der Lunge, welche sich in Bereichen von minimal 1,5 bis  $2 \times 10^3$  Genomen pro  $1 \times 10^6$  Zellen befindet (Simon et al., 2005).

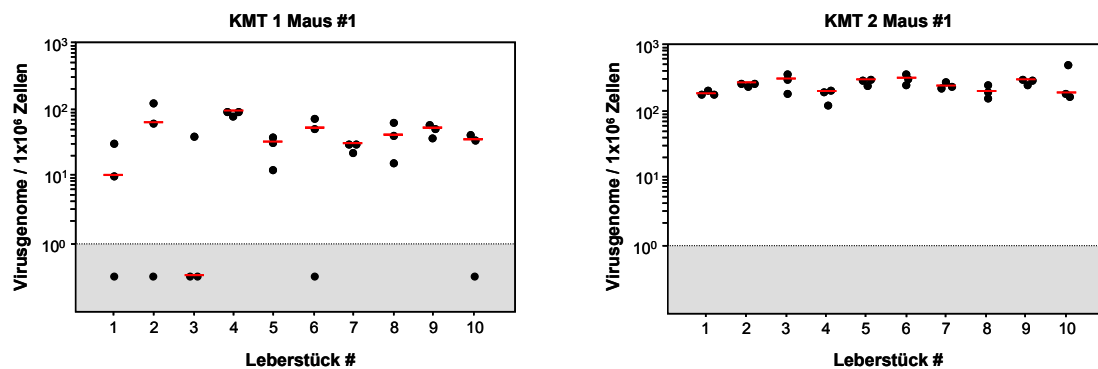
Der Anteil *tdy*-positiver Zellen in der Leber schwankte unter den Individuen zwischen 13% und 28%, wobei keine Korrelation zwischen der Menge *tdy*-positiver Zellen und der Anzahl viraler Genome in der Leber zu erkennen war.



**Abb. 3.15 Virale DNA Load und Anteil *tdy*-positiver Zellen in der Leber**

Isolierte DNA aus drei Lebern latent infizierter Tiere wurde jeweils in eine *M55/gB*- und *pthrp*-spezifische qPCR zur Quantifizierung der viralen DNA Load (linke Abb.) und in eine *tdy*- und *pthrp*-spezifische qPCR zur Ermittlung des Anteils *tdy*-positiver Zellen (rechte Abb.) eingesetzt. Als Standard diente das Plasmid pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy. Die Quantifizierung der viralen DNA Load wurde zweimal als Triplikat (schwarz), die Quantifizierung der *tdy*-positiven Zellen einmal als Triplikat (schwarz) durchgeführt. Alle Quantifizierungen der viralen DNA Load sind jeweils auf  $1 \times 10^6$  Zellen normiert. Die jeweiligen Mediane sind rot dargestellt. Hellgrau unterlegt sind alle Ansätze, in welchen nach 50 PCR Zyklen keine virale DNA detektierbar war.

Zusätzlich wurde getestet, ob latent infizierte Zellen gleichmäßig in der Leber verteilt sind, wie dies beispielsweise in der Lunge der Fall ist (Kurz et al., 1999), oder ob Zellen, die virale Genome tragen, auf bestimmte *spots* fokussiert sind. Dabei wurden aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten KMTs jeweils von einem Tier die Leber entnommen und in 20-30mg schwere Stücke mit ungefähr 2-3mm Kantenlänge unterteilt. Aus 10 dieser Stücke wurde jeweils separat DNA aufgearbeitet und anschließend die virale DNA Load bestimmt.



**Abb. 3.16 Homogene Verteilung der latenten viralen DNA in der Leber**

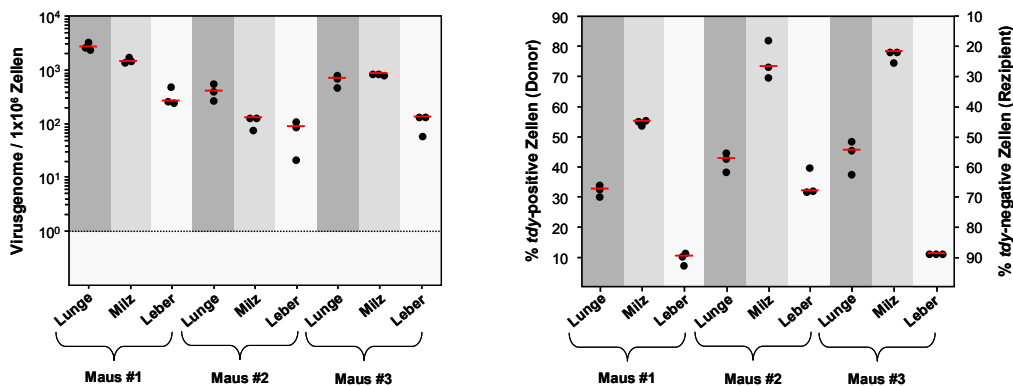
Von jeweils einem latent infizierten Tier aus zwei unterschiedlichen KMTs wurde die Leber entnommen und aus dieser jeweils 10 Stücke geschnitten. Aus diesen wurde DNA aufgereinigt und in eine *M55/gB*- und *pthrp*-spezifische qPCR zur Bestimmung der viralen DNA Load eingesetzt. Als Standard diente das Plasmid pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy. Alle Ansätze wurden als Triplikate quantifiziert (schwarz) und sind auf  $1 \times 10^6$  Zellen normiert dargestellt. Die jeweiligen Mediane sind rot eingezeichnet. Hellgrau unterlegt sind alle Ansätze, in welchen nach 50 PCR Zyklen keine virale DNA detektierbar war.

Das Ergebnis der Quantifizierung der viralen DNA Load aus unterschiedlichen Kompartimenten der Leber ist in Abb. 3.16 gezeigt. Die virale DNA Load war gleichmäßig über die Leber verteilt, es gab kein Stück in einem Tier, in welchem die virale Load signifikant höher war als in anderen Stücken. Allerdings gab es einen Unterschied in der Absolutzahl der Virusgenome zwischen den KMTs. Die Berechnungen des Medians aus

allen Werten ergab für die Maus aus KMT #1  $4 \times 10^1$  Virusgenome pro  $1 \times 10^6$  Zellen und aus KMT #2  $2,5 \times 10^2$  Virusgenome pro  $1 \times 10^6$  Zellen. Hierbei wurde deutlich, daß in der Anzahl latenter viraler Genome aus unterschiedlichen KMTs Schwankungen um den Faktor 5 (bei einem Vergleich mit Abb. 3.15 sogar um den Faktor 10) auftreten können.

### 3.3.2 Reaktivierung von mCMV aus Organexplantaten

Zur Verifizierung der Leber als definiertem Latenzort für mCMV wurden aus drei latent infizierten Tieren jeweils die Leber, die zuvor mit  $37^\circ\text{C}$  warmen PBS perfundiert (2.4.6.3) wurde, und zur Kontrolle auch Lunge und Milz, aseptisch entnommen und die virale DNA *Load* und der Anteil *tdy*-positiver Zellen mittels qPCR bestimmt (Abb. 3.17). Die virale DNA *Load* der Leber lag in allen drei Tieren bei ungefähr 1 bis  $2 \times 10^2$  Virusgenomen pro  $1 \times 10^6$  Zellen. Die meisten Virusgenome wurden in der Lunge detektiert ( $0,5$  bis  $3 \times 10^3$  Genome pro  $1 \times 10^6$  Zellen), die Anzahl der Virusgenome in der Milz ( $0,2$  bis  $1,5 \times 10^3$  Genome pro  $1 \times 10^6$  Zellen) lag zwischen denen der Leber und der Lunge. Erwartungsgemäß war der Anteil *tdy*-positiver Zellen hämatopoetischen Ursprungs in der Milz mit 55-80% am höchsten, wobei die Leber den niedrigsten *tdy* Anteil von 10 bis 30% hatte. Der Anteil der *tdy*-positiven Zellen in der Lunge lag in allen drei Mäusen mit 30 bis 45% zwischen denen der Leber und denen der Milz. Es war, wie auch in 3.3.1 beschrieben, keine Korrelation zwischen der Anzahl viraler Genome und dem Anteil *tdy*-positiver Zellen zu erkennen.

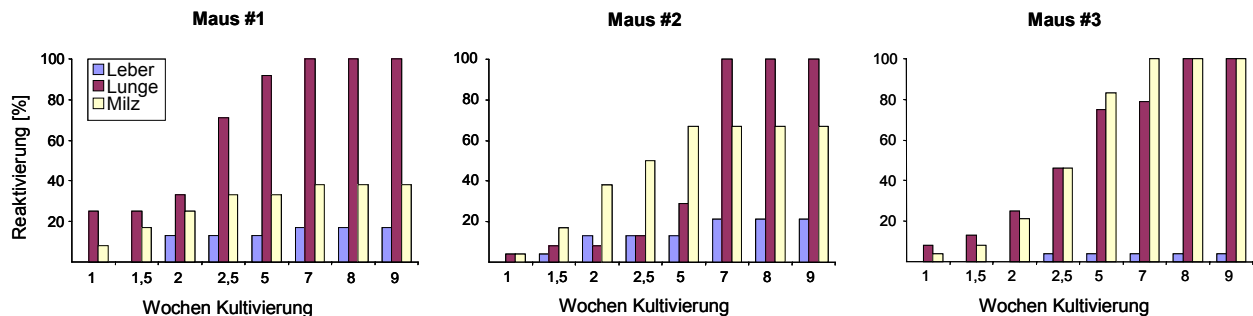


**Abb. 3.17 Virale DNA *Load* und Anteil *tdy*-positiver Zellen in Organexplantaten**

Isolierte DNA aus Lunge, Milz und Leber dreier latent infizierter Tiere wurde in eine *M55/gB-* und *p<sub>thrp</sub>*-spezifische qPCR zur Quantifizierung der viralen DNA *Load* (linke Abb.) und in eine *tdy-* und *p<sub>thrp</sub>*-spezifische qPCR zur Ermittlung des Anteils *tdy*-positiver Zellen (rechte Abb.) eingesetzt. Als Standard diente das Plasmid pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy. Die Menge der Virusgenome ist jeweils auf  $1 \times 10^6$  Zellen normiert. Alle Proben wurden als Triplicate quantifiziert (schwarz). Die jeweiligen Mediane sind rot eingezeichnet.

Parallel zur Bestimmung der viralen DNA *Load* erfolgte die Kultivierung der Organexplantate. Dazu wurden aus den Organen Leber, Lunge und Milz eines jeden Tieres jeweils 24 kleine Stücke mit einer Kantenlänge von ungefähr 2-3mm geschnitten und diese einzeln, wie in 2.7.5 beschrieben, in 24-well Platten inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (1 Woche; 1,5; 2; 2,5; 5; 7; 8 und 9 Wochen) nach Kultivierung der Stückchen wurden 300µl des Überstandes auf MEF übertragen und diese nach zentrifugaler Infektion (2.8.3) mit

Methylcellulose überschichtet (2.6.1). Hatte in einem Gewebeexplantat eine Virusreaktivierung stattgefunden, konnten nach 4 bis 5 Tagen Inkubation auf MEF Plaques nachgewiesen werden (Abb. 3.18).



### Abb. 3.18 mCMV Reaktivierung aus Gewebeexplantaten

Latent infizierte Organe aus 3 Tieren wurden gestückelt und auf jeweils eine 24-well Platte (ein Stückchen pro well) gegeben. Zu den oben angegebenen Zeitpunkten wurde eine definierte Menge Kulturüberstand der jeweils 24 Leber- (blau), Lungen- (rot) und Milzkulturen (gelb) einzeln auf MEF zum Plaquesassay überführt. Die Reaktivierung ist in % auf jeweils eine 24-well Platte bezogen angegeben (ein positives Reaktivierungsereignis  $\triangleq 1/24$  Platte  $\triangleq 4,25\%$ ). Für die Tabelle der positiven Ereignisse und die Abb. der Reaktivierungen der einzelnen 24-well Platten mit jeweiliger Plaqueszahl siehe Anhang Abb. 6.2.

Wie in Abb. 3.18 deutlich gezeigt, konnten in allen getesteten Organen der drei latent infizierten Mäuse Reaktivierungen nachgewiesen werden. Allerdings entstanden in den Leberstücken der drei getesteten Tiere sehr wenige (1 bis maximal 5 pro 24-well Platte) Reaktivierungsereignisse, während alle Lungenexplantate nach 7 bis 8 Wochen Kultur reaktivierten. Dies steht in Einklang zu einer früher veröffentlichten Arbeit, worin die Lunge als ein Hauptort der CMV Latenz und Reaktivierung beschrieben wird (Balthesen et al., 1993). In der Milz war die Reaktivierung unterschiedlich stark ausgeprägt, nur in Maus #3 zeigten alle Stücke nach 8 Wochen Kultur eine Reaktivierung, wohingegen die Anteile der Reaktivierungen der anderen zwei Tiere nach 9 Wochen Kultur zwischen 30% und 70% betragen. Ebenfalls konnten Unterschiede zwischen den Zeitpunkten der Reaktivierung aus den verschiedenen Organen beobachtet werden. Während nach 1 Woche in allen Ansätzen der Lungen- und Milzkulturen schon Reaktivierungen nachzuweisen waren, wurden die ersten Reaktivierungen der Leberkulturen mit 1,5 bis 2,5 Wochen zeitversetzt detektiert.

### Zusammenfassung:

In der Leber latent infizierter Mäuse sind virale Genome nachweisbar, die durch Kultivierung von Gewebestücken *ex vivo* isolierter Lebern ohne zusätzliche Immunsuppression wieder reaktivieren können. Allerdings ist die Anzahl viraler Genome in der latent infizierten Leber und die Menge der daraus erfolgenden Reaktivierungsereignisse sehr viel geringer als in Lunge oder Milz.



### 3.4 Virale DNA Load in Hepatozyten

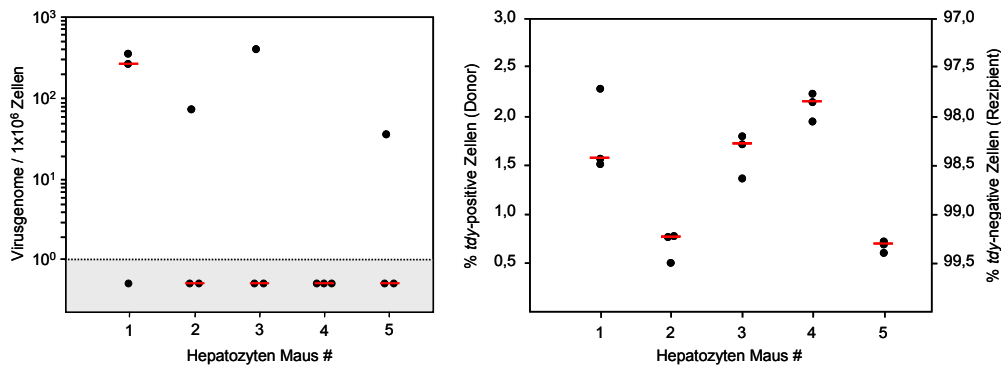
Nachdem gezeigt wurde, dass in latent infizierten Tieren die virale DNA Load der Leber etwa 1 bis  $5 \times 10^2$  Virusgenome pro  $1 \times 10^6$  Zellen beträgt und auch eine mCMV Reaktivierung aus der Leber ohne vorherige Immunsuppression erzielt werden kann, sollte nun die virale DNA Load in den verschiedenen zellulären Kompartimenten der Leber bestimmt werden. Dazu wurde mit dem Hauptzelltyp der Leber, den Hepatozyten, begonnen.

Während der akuten Infektion ist die virale DNA in der Leber hauptsächlich parenchymal in Hepatozyten konzentriert (Ruebner et al., 1964; Podlech et al., 1998), wobei in latent infizierten Tieren in der Leber immunhistologisch keine viruspositiven Zellen mehr nachzuweisen sind.

Zum Nachweis viraler Genome in Hepatozyten wurden Hepatozyten, wie unter 2.4.5 und 2.5.1 beschrieben, aus Lebern 5 latent infizierter Mäuse aufgereinigt. Dazu wurde als Perfusionsmedium zuerst ein Calcium-freier Puffer eingesetzt, um die *tight junction*-vermittelten Zell-Zell Kontakte zu lösen (Seglen 1972; Denker & Nigam, 1998). Der für den zweiten Perfusionsschritt eingesetzte Kollagenasepuffer wurde mit Calcium supplementiert, da die Kollagenase Calcium als Kofaktor benötigt (Seglen 1973a; Seglen 1973b).

Nach Separation der Zellen wurden die Hepatozyten gezählt und mit Trypanblau auf Viabilität geprüft. Aus einer Leber konnten etwa 3 bis  $6 \times 10^7$  Zellen mit einer Viabilitätsrate von ungefähr 70-80% isoliert werden. Lichtmikroskopisch sind Hepatozyten aufgrund ihrer Größe sehr gut von anderen Zellen, wie beispielsweise Endothel oder Kupffer Zellen, zu unterscheiden. Mit der beschriebenen Aufreinigung konnten Hepatozytenanreicherungen von ungefähr 90%iger Reinheit erzielt werden.

Die Ergebnisse der *M55/gB*-, *pthrp*- und *tdy*-spezifischen qPCR zur Quantifizierung der viralen Genome und des Anteils *tdy*-positiver Zellen der isolierten Hepatozytenfraktionen sind in Abb. 3.19 dargestellt. Dabei war deutlich zu erkennen, dass in Hepatozyten keine viralen Genome, bzw. nur einige wenige - eventuell bedingt durch Kontamination anderer virustragender Zellen - nachweisbar waren. Da Hepatozyten Zellen entodermalen Ursprungs sind, wäre eine 100% reine Hepatozytenpopulation negativ für die Quantifizierung mit *tdy*. Die hier nachgewiesenen 0,75 bis 2,5% *tdy*-positiven Zellen sind demzufolge auf kontaminierende Zellen hämatopoetischen Ursprungs, wie beispielsweise Kupffer Zellen, LALs oder Leber-DCs, zurückzuführen.



### Abb. 3.19 Virale DNA Load und Anteil *tdy*-positiver Zellen in Hepatozyten

Isolierte DNA aus den angereicherten Hepatozyten von 5 latent infizierten Mäusen wurde in eine *M55/gB*- und *pthrp*-spezifische qPCR zur Quantifizierung der viralen DNA Load (linke Abb.) und in eine *tdy*- und *pthrp*-spezifische qPCR zur Ermittlung des Anteils *tdy*-positiver bzw. *tdy*-negativer Zellen (rechte Abb.) eingesetzt. Als Standard diente das Plasmid pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy. Alle Proben wurden als Triplikate quantifiziert (schwarz) und der jeweilige Median der Triplikate wurde eingezeichnet (rot). Alle Quantifizierungen der viralen DNA Load sind auf  $1 \times 10^6$  Zellen normiert. Hellgrau unterlegt sind alle Ansätze, in welchen nach 50 PCR Zyklen keine virale DNA detektierbar war.

#### Zusammenfassung:

Die Anreicherung von Hepatozyten aus der Leber latent infizierter Mäuse führte in vier von fünf getesteten Tieren nicht zu einer Co-Anreicherung viraler Genome. Damit konnte eindeutig bewiesen werden, dass die Hepatozyten nicht der latent infizierte Zelltyp in der Leber sind.

## 3.5 Separation nichtparenchymaler Zellen mittels Gegenstromzentrifugation

Neben den Hepatozyten befinden sich in der Leber noch verschiedene nichtparenchymale (stromale und nicht-stromale) Zellpopulationen, wobei der Großteil dieser Populationen die hepatischen Sinusoide auskleidet. Zwei Zelltypen bilden den Hauptanteil der nichtparenchymalen Fraktion: die sinusoidalen Endothelzellen der Leber (LSEC) und die Kupffer Zellen. Diese zwei Zelltypen können durch eine Aufreinigung mittels Gegenstromzentrifugation (Knook & Sleyster, 1976; Steffan et al., 1986) in einem Elutriationsrotor (Glick et al., 1971) voneinander getrennt und separat angereichert werden.

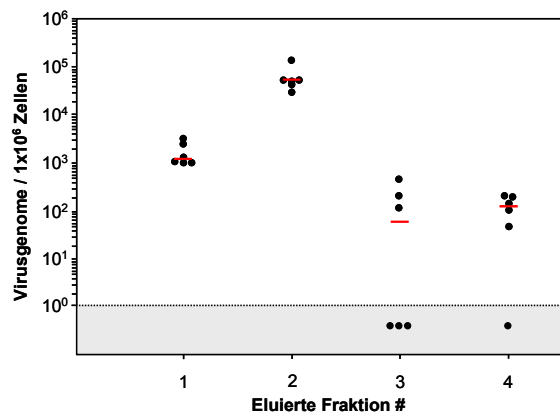
### 3.5.1 Bestimmung der viralen DNA Load in Endothel und Kupffer Zellen

Nachdem zuvor ausgeschlossen werden konnte, dass sich latentes virales Genom im Leberparenchym (den Hepatozyten) befindet, sollten nun die nichtparenchymalen Zellen analysiert werden. Dazu wurden die Lebern aus 5 Mäusen zusammengeführt, wie unter 2.4.6.1 und 2.5.2 beschrieben aufgearbeitet und die Endothel und Kupffer Zellen mittels

Gegenstromzentrifugation (Elutriation; 2.5.3) getrennt. Es wurden folgende 4 Fraktionen gesammelt:

- Fraktion #1: noch vorhandene Lymphozyten, Endothelzellen
- Fraktion #2: Endothelzellen
- Fraktion #3: Endothelzellen und Kupffer Zellen
- Fraktion #4: Kupffer Zellen

Aus allen Fraktionen wurde separat die DNA isoliert und mittels *M55/gB*- und *pthrp*-spezifischer qPCR die virale DNA *Load* quantifiziert. Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in Abb. 3.20 dargestellt.



**Abb. 3.20 Bestimmung der viralen DNA Load in Endothel- und Kupfferzellen**

Aus 5 Lebern latent infizierter Mäuse wurden nichtparenchymale Zellen isoliert und die Zellen mittels Gegenstromzentrifugation in 4 Fraktionen aufgetrennt. Aus diesen wurde DNA isoliert und die virale DNA *Load* mit einer *M55/gB*- und *pthrp*-spezifischen qPCR bestimmt. Als Standard wurde das Plasmid pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy eingesetzt. Alle Proben wurden zweimal als Triplikate quantifiziert (schwarz) und der jeweilige Median wurde eingezeichnet (rot). Fraktion #1: Endothelzellen und Lymphozyten, Fraktion #2: Endothelzellen, Fraktion #3: Endothel und Kupffer Zellen und Fraktion #4: Kupffer Zellen. Hellgrau unterlegt sind alle Ansätze, in welchen nach 50 PCR Zyklen keine virale DNA detektiert werden konnte.

Es ist deutlich zu erkennen, dass in der Endothelzellfraktion mit  $6 \times 10^4$  Virusgenomen pro  $1 \times 10^6$  Zellen die höchste Menge viraler Genome nachgewiesen werden konnten, während in den restlichen drei Fraktionen die Menge viraler Genome sehr stark reduziert war. So konnten in der Lymphozytenfraktion nur noch  $1 \times 10^3$  Virusgenome pro  $1 \times 10^6$  Zellen und in der Endothel/Kupffer Zell- bzw. in der Kupffer Zell-Fraktion nur noch  $1 \times 10^2$  Virusgenome pro  $1 \times 10^6$  Zellen nachgewiesen werden.

Diese Methode der Aufreinigung wurde allerdings in der restlichen Arbeit nicht weiter angewendet, da sie folgende Nachteile hatte: Die Zellen wurden aufgrund ihrer Größe und ihres Gewichts getrennt, wodurch sich Überlappungen der einzelnen Fraktionen ergaben. Aus diesem Grunde wurden auch die erste und dritte Fraktion mit berücksichtigt, da auch in diese Endothelzellen ausgespült wurden, d.h. die Trennung der einzelnen Fraktionen ist nicht quantitativ, sondern „schmiert“. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist, dass eine hohe Anzahl latent infizierter Tiere pro Elutriation benötigt wird. Da die nichtparenchymalen Zellen aus den Lebern von mindestens 5 Mäusen ( $2 \times 10^7$  Zellen) eingesetzt werden müssen, um eine korrekte Ausbildung des Gradienten in der Gegenstromzentrifugation zu gewährleisten (Lutz et al., 1992; Furst: *Application information: synchronizing cultured cells*

by *centrifugal elutriation*, Beckman Instruments, Inc., 1995), können diese Versuche aufgrund des hohen Verbrauchs an Tieren nicht oft durchgeführt werden.

Zusammenfassung:

Die Separation nichtparenchymaler Zellen mittels Gegenstromzentrifugation zeigte eine deutliche Anreicherung virale Genome in der Endothelzellfraktion.

### **3.6 FACS Analysen und MACS Separation nichtparenchymaler Zellen**

Neben der zentrifugalen Elutriation wurde die Auftrennung der nichtparenchymalen Zellen in einem weiteren Ansatz mittels MACS *Micro-Beads* getestet, da hierbei eine Separation mit Antikörpern (Ak) unabhängig von einer Mindestzellzahl durchgeführt werden kann. Des Weiteren können auch minore Zellpopulationen aus der nichtparenchymalen Zellfraktion aufgereinigt und nicht nur Endothel- und Kupfferzellen voneinander getrennt werden.

#### **3.6.1 FACS Analysen nichtparenchymaler Zellen**

Die aus Kapitel 3.5 erhaltenen Ergebnisse gaben einen Hinweis darauf, dass sich das latente Genom vermutlich in der Endothelzellfraktion und nicht in der Kupfferzellfraktion befindet. Um das Ergebnis, dass Endothelzellen der latent infizierte Zelltyp sind, zu bestätigen, wurde ein Sortiment an MACS *Micro-Beads* und fluoreszenzmarkierten Ak zur Charakterisierung aufgereinigter nichtparenchymaler Leberzellen im FACS zusammengestellt, welches zuerst an Leberzellen nicht infizierter Mäuse getestet wurde. Die Ak, bzw. die mit Ak gekoppelten paramagnetischen *Beads*, die zur Separation der nichtparenchymalen Zellen verwendet wurden, sind in Tab. 3.1 gelistet.

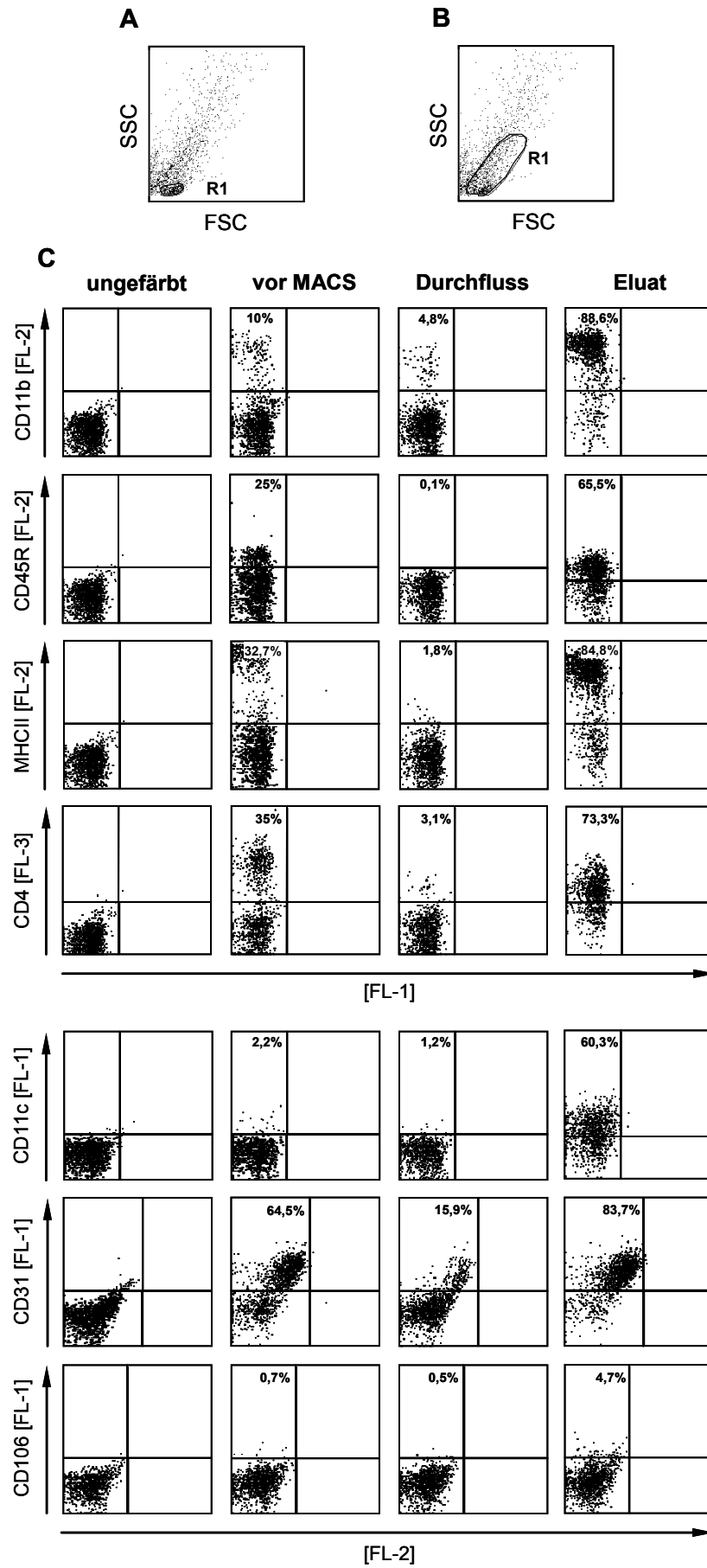
**Tab. 3.1 Für MACS Separation verwendete Ak, bzw. Ak-gekoppelte Beads**

Ak bzw. Ak-gekoppelte paramagnetische Beads	Spezifität	Referenz
CD4	T-Zellen	Klugewitz et al., 2002 Khandoga et al., 2006
CD11b	Dendritische Zellen und NK Zellen	Banchereau & Steinman, 1998 Lau & Thomson, 2003 Lian et al., 2003
CD11c	Dendritische Zellen	Banchereau & Steinman, 1998 Lau & Thomson, 2003 Lian et al., 2003
CD31 (PECAM-1)	Endothelzellen, Monozyten, T-Zell Untergruppen	Newman et al., 1990 Newman, 1996 Newman, 1999
CD45R (B220)	Dendritische Zellen und Lymphozyten, B-Zellen	Jomantaité et al., 2004 Wu & Russell, 1992
CD106 (VCAM-1)	Aktivierte Endothelzellen	Wang et al., 1999
MHC Klasse II	Antigenpräsentierende Zellen	Hume, 1985 Rubinstein et al., 1986 Rubinstein et al., 1987

Sechs Lebern nicht infizierter Mäuse wurden zusammen aufgearbeitet und die nichtparenchymalen Zellen aufgereinigt (2.4.6 und 2.5.2). Anschließend erfolgte die Separation mittels autoMACS (2.12.1.1) und den in Tab. 3.1 aufgeführten Ak. Die einzelnen Fraktionen, die bei der MACS Separation entstanden, wurden zytofluorometrisch (2.12.2) analysiert (Abb. 3.21). Untersucht wurden immer eine ungefärbte Kontrolle, die gefärbten nichtparenchymalen Zellen, die nicht über MACS aufgereinigt wurden, der Durchfluss und das Eluat aus der MACS Aufreinigung.

Wie in Abb. 3.21 gezeigt ist, konnte in jedem Eluat – außer bei CD106 - eine Anreicherung der MACS-separierten Zellen nachgewiesen werden, während im Durchfluss sehr wenige bis keine positiven Zellen detektiert wurden. Die Reinheit der einzelnen Eluate der jeweiligen Separationen betrug zwischen 60 und 90% (Abb. 3.21c).

CD106-positive Zellen konnten weder in der nichtparenchymalen Fraktion noch im MACS Eluat detektiert werden (Abb. 3.21c). Eine mögliche Erklärung liefert die Tatsache, dass die Expression von CD106, das ein Adhäsionsmolekül auf Endothelzellen ist, erst durch Cytokine induziert werden muss (Osborn *et al.*, 1989). Ist die Expression von CD106 durch fehlende Stimulation verringert, kann eine Detektion dieses Moleküls negativ ausfallen und somit auch eine Anreicherung fehlschlagen.

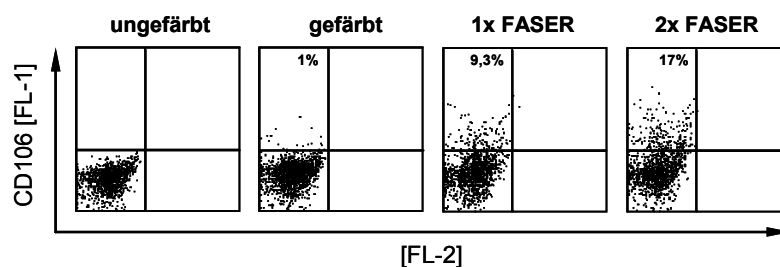


**Abb. 3.21 Isolierung unterschiedlicher Zellpopulationen aus nichtparenchymalen Zellen**

Die Anreicherung isolierter nichtparenchymaler Zellen mittels CD11b, CD45R (B220), MHC Klasse II, CD4, CD11c, CD31 und CD106 spezifischen MACS *Micro-Beads* wurde im FACS kontrolliert. Dazu wurde zur Analyse von CD11b, CD45R, MHC Klasse II, CD4 und CD11c ein elektronisches Fenster (R1) um die Lymphozytenpopulation gelegt (A), welches für die Messung von Zellen spezifisch für Endothelzellmarker (CD31 und CD106) vergrößert wurde (B). C: Im FACS wurde für jede Probe eine ungefärbte Kontrolle, die nichtparenchymalen Zellen vor MACS Aufreinigung, der MACS Durchfluss und das MACS Eluat analysiert. Zur Messung wurden die folgenden fluoreszenzmarkierten Ak eingesetzt: CD11b PE, CD45R PE, MHC Klasse II PE, PE-Cy5, CD11c FITC, CD31 FITC und CD106 FITC. Für jede Probe wurden 30.000 Zellen aufgenommen.

Um die sehr geringe Expression von CD106, das sich auf Zellen, die die Sinusoide auskleiden, befindet (Wang et al., 1999), eventuell doch nachzuweisen wurde der Versuch unternommen, die Fluoreszenzintensität von gebundenem CD106 Ak mit Hilfe des sogenannten FASER Kits (*Fluorescence Amplification by Sequential Employment of Reagents*, Miltenyi Biotech) stufenweise zu erhöhen. Dazu wurden zu den gefärbten nichtparenchymalen Zellen zuerst ein fluorochromspezifischer FITC-Aktivator und danach ein fluorochromkonjugierter FITC-Verstärker dazugegeben, wobei diese Zugaben wiederholt werden konnten. In Abb. 3.22 sind zweimalige Inkubationen nichtparenchymaler Zellen mit dem FASER-Kit und CD106 dargestellt.

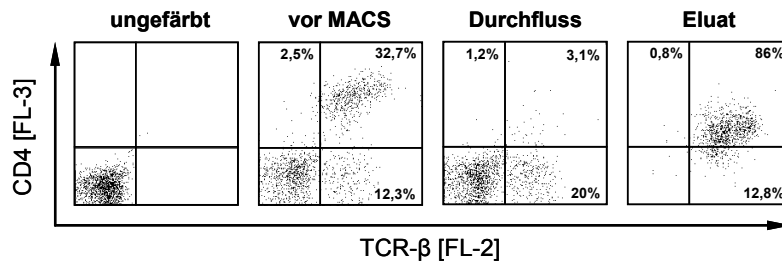
In den Ansätzen für CD106 war nach zweimaliger Erhöhung der Fluoreszenzintensität ein Anstieg der nachweisbaren Zellen von 1% in der gefärbten Probe auf 9% im Ansatz „1x FASER“, bzw. 17% im Ansatz „2x FASER“ zu sehen, was darauf hinweist, dass in den aufgereinigten Proben einige positive Zellen zu finden sind, die das Oberflächenantigen CD106 allerdings nur sehr schwach exprimieren.

**Abb. 3.22 Erhöhung des Anteils nachweisbarer Zellen durch Erhöhung der Fluoreszenzintensität von CD106**

Isolierte nichtparenchymale Zellen wurden mit anti-CD106 FITC gefärbt und eine etwaige Verstärkung der Fluoreszenzintensität mittels des FASER Kits im FACS getestet. Dargestellt sind die ungefärbte Kontrolle, mit CD106 gefärbte nichtparenchymale Zellen und nichtparenchymale Zellen nach einmaliger, bzw. zweimaliger FASER Behandlung. Die Zellen wurden, wie unter 3.23B gezeigt, auf das elektronische Fenster R1 eingestellt. Pro Ansatz wurden 30.000 Zellen analysiert.

In der nichtparenchymalen Fraktion können im Lymphozyten Fenster (Abb. 3.21a) 35% CD4-positive Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.21c). Die Expression von CD4 ist dabei nicht nur auf T-Zellen beschränkt, auch andere Zellen, wie beispielsweise Untergruppen der DCs, können CD4 exprimieren (Lian et al., 2003). Im folgenden Versuch soll nun geklärt werden, ob die aus der nichtparenchymalen Zellfraktion isolierten CD4-positiven Zellen ausschließlich T-Zellen sind. Für die Anreicherungen CD4-positiver Zellen wurden deshalb Doppelfärbungen mit CD4 und TCR- $\beta$  durchgeführt, womit gezeigt werden konnte, dass alle

CD4-positiven Zellen auch TCR- $\beta$  positiv und somit alle mit CD4 *Micro-Beads* eluierten Zellen T-Zellen sind (Abb. 3.23).



### Abb. 3.23 FACS Analysen für CD4 positive und TCR positive Zellen

Aus isolierten nichtparenchymalen Zellen wurden mittels MACS Separation CD4-positive Zellen angereichert. Dargestellt sind die ungefärbte Kontrolle und die Doppelfärbungen mit CD4 PE-Cy5 und TCR- $\beta$  PE vor MACS, im MACS Durchfluss und im MACS Eluat. Die Zellen wurden, wie in Abb. 3.23A dargestellt, auf das elektronische Fenster R1 für Lymphozyten eingestellt. Pro Messung wurden 30.000 Zellen aufgenommen.

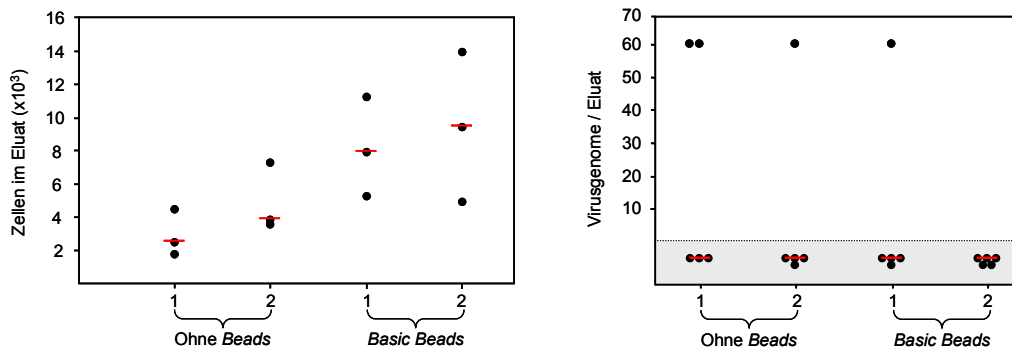
Durch die MACS Separationen aufgereinigter Leberzellen konnte gezeigt werden, dass in der Gesamtheit der nichtparenchymalen Zellfraktion Lymphozyten wie T-Zellen und B-Zellen, DCs, Endothelzellen und allgemein MHC Klasse II-positive antigenpräsentierende Zellen nachweisbar sind.

## 3.6.2 MACS Separation nichtparenchymaler Zellen aus latent infizierten Lebern

Für die Separationen mit den in Tab. 3.1 gelisteten MACS *Micro-Beads* wurden aus den Lebern von 5 latent infizierten Tieren nichtparenchymale Zellen aufgereinigt. Zusätzlich zu den eingesetzten *Micro-Beads* wurden als Negativkontrollen Zellen ohne *Beads* und Zellen mit sogenannten *Basic-Beads* - also *Beads* ohne konjugierte Ak - behandelt und in die MACS Separation eingesetzt. Nach der Separation wurde aus den Zellen die DNA aufgereinigt, um die viralen Genome und die Anzahl *tdy*-positiver Zellen mittels *ie3*-, *pthrp*- und *tdy*-spezifischer qPCR zu quantifizieren.

In Abb. 3.24 sind die Bestimmungen von Zellzahlen und von viralen Genomen in den Negativkontrollen dargestellt. Dabei wurden die in der qPCR quantifizierten Zellen und Virusgenome auf das Gesamtvolumen des MACS Eluats hochgerechnet. Die Darstellung zeigt, dass Zellen von der Säule eluiert wurden (im Median zwischen  $2 \times 10^3$  bis  $1 \times 10^4$  Zellen), auch wenn die Proben keine *Beads* enthielten, was dafür spricht, dass ein kleiner Teil der Zellen „unspezifisch“ an der Säule bindet. Die Zahl dieser unspezifisch eluierten Zellen erhöhte sich noch, wenn die Proben vorher mit *Basic-Beads* inkubiert wurden. Ausgehend von  $1 \times 10^6$  in die MACS Aufreinigung eingesetzten Zellen und  $1 \times 10^4$  nachgewiesenen Zellen im Eluat muss mit einem geringen Anteil unspezifisch gebundener Zellen im MACS Eluat gerechnet werden.

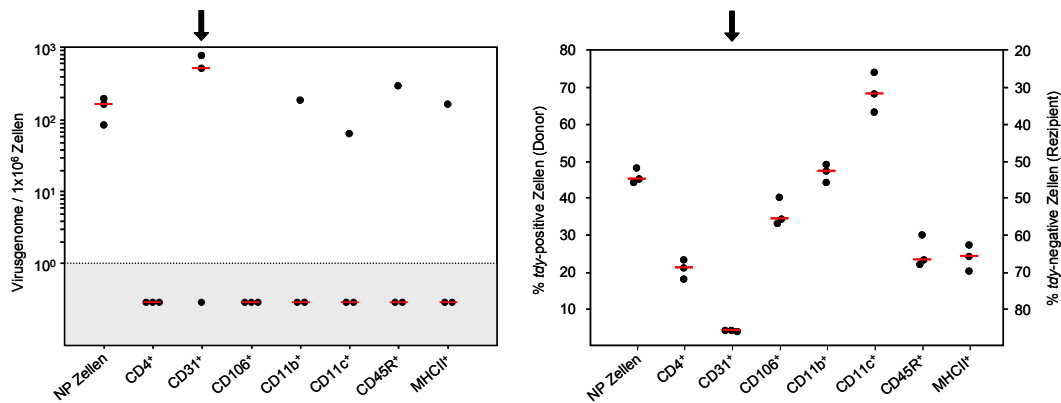




**Abb. 3.24 Bestimmung der Zellzahl und Quantifizierung der Virusgenome in Negativkontrollen nach MACS Separation**

Jeweils  $1 \times 10^6$  nichtparenchymale Zellen wurden entweder direkt, d.h. ohne *Beads*, oder mit *Basic-Beads* (*Beads* ohne konjugierte Ak) inkubiert und mit dem autoMACS separiert. Aus den Eluaten wurde DNA aufgereinigt und mit einer *pThrp*-spezifischen qPCR die Anzahl der Zellen (linke Abb.) und mit einer *M55/gB*-spezifischen qPCR die Anzahl der viralen Genome (rechte Abb.) quantifiziert. Aus allen vier Proben wurde jeweils  $\frac{1}{30}$  der gesamten aufgereinigten DNA in die qPCR eingesetzt und die quantifizierten Werte in der Darstellung auf die gesamte Probe hochgerechnet. Die quantifizierten Werte sind schwarz, die korrespondierenden Mediane rot dargestellt. Hellgrau unterlegt sind alle Ansätze, in welchen nach 50 PCR Zyklen keine virale DNA detektierbar war.

In Abb. 3.24 wird deutlich, dass sich unter den unspezifisch gebundenen Zellen auch Zellen befanden, die virales Genom trugen, welches quantifiziert wurde. Die unspezifische Bindung der Zellen lässt sich bei einer MACS Separation nicht komplett vermeiden. Da aber alle Ansätze immer gleich behandelt wurden, sollten sich virale Genomanreicherungen, bzw. Genomabnahmen trotz eines vorhandenen Hintergrundes in einzelnen Fraktionen erkennen lassen.



**Abb. 3.25 Virusgenome und Anteil *tdy*-positiver Zellen nach MACS Separation**

Pro Separation wurden  $1 \times 10^6$  nichtparenchymale Zellen aus latent infizierten Tieren eingesetzt und die jeweilige Fraktion mittels *Micro-Beads* für CD4, CD31, CD106, CD11b, CD11c, CD45R und MHC Klasse II angereichert. Aus den einzelnen Fraktionen wurde DNA isoliert und in eine *ie3*- und *pThrp*-spezifische qPCR zur Quantifizierung der viralen DNA Load (linke Abb.) und in eine *tdy*- und *pThrp*-spezifische qPCR zur Ermittlung des Anteils *tdy*-positiver Zellen (rechte Abb.) eingesetzt. Als Standard diente das Plasmid pDrive\_IE3\_PThrP\_Tdy. Dargestellt sind die Quantifizierungen viraler DNA und *tdy*-positiver Zellen, jeweils als Triplikate gemessen (schwarz) mit den entsprechenden Medianen (rot). Die Pfeile kennzeichnen die isolierten CD31 positive Zellen. Hellgrau unterlegt sind alle Ansätze, in welchen nach 50 PCR Zyklen keine virale DNA nachweisbar war.

Wie in Abb. 3.25 deutlich zu erkennen ist, war der Nachweis viraler Genome in fast allen isolierten Proben der mit den verschiedenen *Micro-Beads* aufgereinigten Zellfraktionen

negativ, bis auf die CD31-positive Fraktion. Von  $1,5 \times 10^2$  Virusgenomen pro  $1 \times 10^6$  Zellen in der nichtparenchymalen Fraktion war in der CD31-positiven Fraktion eine Anreicherung von  $6 \times 10^2$  Virusgenomen pro  $1 \times 10^6$  Zellen zu sehen. CD31 ist sowohl ein Marker für Endothelzellen als auch für B-Zellen. Zur Unterscheidung dieser beiden Zelltypen konnte die Quantifizierung von *tdy* herangezogen werden. Sie ergab, dass in der Fraktion nahezu keine Zellen hämatopoetischen Ursprungs sind. Nur 5% der separierten CD31-positiven Zellen von ursprünglich 45% *tdy*-positiver nichtparenchymaler Zellen waren *tdy*-positiv, deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die angereicherten Zellen in dieser Fraktion fast ausschließlich Endothelzellen sind.

In diesem Abschnitt konnte mit den immunologischen Methoden der MACS Separation und der zytofluorometrischen Charakterisierung gezeigt werden, dass virale Genome in der CD31-positiven Zellfraktion angereichert sind. Damit konnten die in 3.5 erhaltenen Ergebnisse der Separation von Endothel und Kupffer Zellen durch zentrifugale Elutriation noch einmal unabhängig mit einer anderen Separationsmethode bestätigt werden.

#### Zusammenfassung:

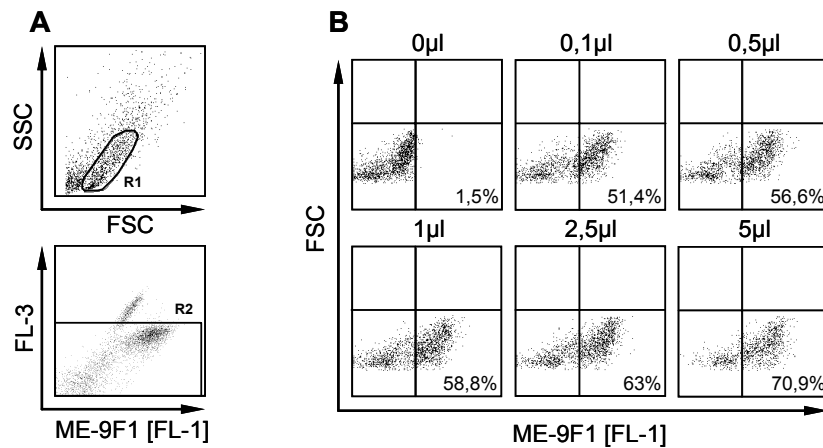
Durch MACS Separation nichtparenchymaler Zellen konnten virale Genome in der CD31-positiven Endothelzellfraktion angereichert werden, während alle anderen Fraktionen negativ waren. Die latent infizierten CD31-positiven Endothelzellen sind nicht hämatopoetischen Ursprungs, da sie zu 95% *tdy*-negativ sind.

### **3.7 Test des ME-9F1 ( $\alpha$ -LSEC) Antikörpers**

Um Endothelzellen aus der Leber zu isolieren wurde ein  $\alpha$ -LSEC Ak benutzt, welcher spezifisch für sinusoidale Endothelzellen der Leber ist. Dieser ausschließlich mit Endothelzellen und glatten Muskelzellen reagierende Ak wurde erstmals 1991 beschrieben (Harder et al.). Zuerst wurde der Ak (ME-9F1 Klon) über Prof. Hamann in Berlin bezogen, später war es möglich, diesen direkt an magnetische *Micro-Beads* ( $\alpha$ -LSEC Ak, ebenfalls ME-9F1 Klon) gekoppelt oder fluoreszenzmarkiert über Miltenyi-Biotec (Bergisch Gladbach) zu beziehen. In den folgenden Versuchen wurde zunächst getestet, welche Ak Konzentration ausreichend für eine FACS Färbung ist, wie effizient die MACS Anreicherungen für ME-9F1-positive Zellen sind und wie hoch die Reinheit der isolierten LSEC Population ist. Im Anschluss daran wurden die LSEC Oberflächenmarker analysiert und zytofluorometrische Trennungen durchgeführt, um die LSEC Subpopulation genauer zu charakterisieren.

#### **3.7.1 ME-9F1 Antikörper Titration**

Zunächst erfolgte eine Titration des ME-9F1 Ak, um für nachfolgende Analysen der LSEC die optimale Ak Konzentration zu ermitteln. Dazu wurden nichtparenchymale Zellen mit unterschiedlichen Ak Konzentrationen gefärbt und im FACS analysiert. Folgende Ak Mengen wurden eingesetzt: 0,1  $\mu$ l, 0,5  $\mu$ l, 1  $\mu$ l, 2,5  $\mu$ l und 5  $\mu$ l. In Abb. 3.26 sind alle Titrationsstufen der gefärbten nichtparenchymalen Zellen dargestellt.



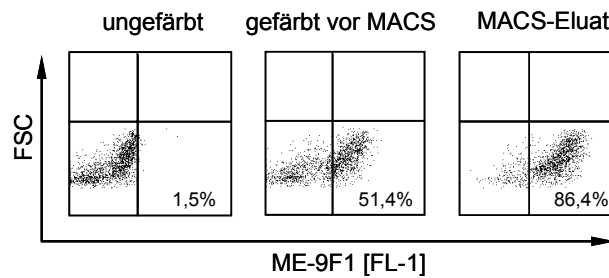
### Abb.3.26 Titration des ME-9F1 Ak auf nichtparenchymalen Zellen

Aus Lebern nicht infizierter Mäuse wurden nichtparenchymale Zellen aufgereinigt und jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen pro Färbung in eine Titrationsreihe des ME-9F1 FITC Ak eingesetzt. A: Die Zellen wurden auf R1 (oben) und zusätzlich auf R2 gegatet (unten), um die durch den Kollagenaseverdau entstandene Autofluoreszenz auszuschließen. B: Die Messung ME-9F1-positiver Zellen erfolgte in FL-1 gegen FSC. Titrationsstufen: 0µl, 0,1µl, 0,5µl, 1µl, 2,5µl und 5µl ME-9F1 Ak. Die Menge positiver Zellen ist für jede Verdünnungsstufe in % angegeben. Für jeden Ansatz wurden 10.000 Zellen aufgenommen.

Wie in Abb. 3.26 gezeigt, war schon 0,1µl ME-9F1 Ak pro  $1 \times 10^6$  Zellen für eine effiziente Färbung ausreichend, wobei die Anzahl ME-9F1-positiver Zellen bei steigender Ak Konzentration noch weiter zunahm. Bei der höchsten eingesetzten ME-9F1 Ak Konzentration von 5µl pro Ansatz wurden in der nichtparenchymalen Fraktion 71% ME-9F1-positiv Zellen gemessen. In früheren Arbeiten konnte hingegen gezeigt werden, dass die nichtparenchymale Fraktion nur zu ungefähr 50% aus Endothelzellen besteht (Blouin et al., 1977; Übersicht: Racanelli & Rehmann, 2006). Dieser Befund wird gestützt durch ein vorheriges Versuchsergebnis (Abb. 3.25), in dem 45% *tdy*-positive Zellen in der nichtparenchymalen Fraktion quantifiziert wurden. Entsprechend befinden sich in der nichtparenchymalen Fraktion 55% *tdy*-negative Zellen, die zum größten Teil Endothelzellen sind (1.9.2). Dies deutet darauf hin, dass der Einsatz hoher Ak Konzentrationen zu unspezifischen Bindungen führt. Der Ak wurde daraufhin in allen folgenden Experimenten 0,1µl pro  $1 \times 10^6$  Zellen eingesetzt und so an die jeweilige Menge nichtparenchymaler Zellen angepasst. Die Autofluoreszenzen, die sehr oft nach dem Kollagenaseverdau (2.4.6 und 2.5.2) der Lebern auftraten, konnten durch Definition eines zweiten Fensters (R2), wie in Abb. 3.26A unten dargestellt, weitestgehend ausgeschlossen werden.

### 3.7.2 MACS Separationen mit dem ME-9F1 Antikörper

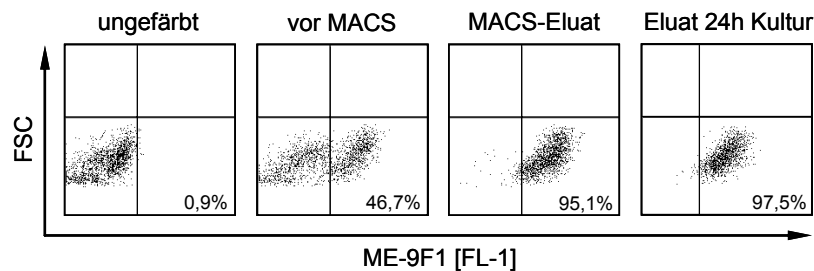
Nachdem die optimale Ak Konzentration ermittelt worden war, wurde der ME-9F1 Ak in die MACS Separation eingesetzt. Dazu wurden die nichtparenchymalen Zellen unbehandelter Mäuse mit ME-9F1 FITC oder ME-9F1 Biotin und anschließend mit der entsprechenden Menge an  $\alpha$ -FITC oder  $\alpha$ -Biotin *Micro-Beads* inkubiert (Klugewitz et al. 2002) und die ME-9F1-positiven Zellen (LSEC) nach Elution im FACS analysiert (Abb. 3.27). Es ist zu erkennen, dass durch die MACS Aufreinigung eine Anreicherung von 50% auf 85% ME-9F1-positiv Zellen im MACS Eluat erreicht werden konnte.



### Abb. 3.27 MACS Separation ME-9F1 gefärbter nichtparenchymaler Zellen

Isolierte nichtparenchymale Zellen wurden mit ME-9F1 FITC gefärbt und die ME-9F1-positiven Zellen (LSEC) nach Inkubation mit  $\alpha$ -FITC *Micro-Beads* durch MACS Separation angereichert. Dargestellt sind die FACS Ergebnisse der ungefärbten nichtparenchymalen Zellen und die gefärbten Zellen vor und nach MACS Separation, jeweils in FL-1 gegen FSC aufgetragen. Die elektronischen Fenster wurden wie in Abb. 3.26A dargestellt eingestellt. Pro Ansatz wurden jeweils 10.000 Zellen aufgenommen. In den rechten unteren Quadranten ist die prozentuale Menge der positiven Zellen vermerkt.

Die eluierten Zellen wurden im nächsten Versuch für 24h in Kultur genommen, um zu überprüfen, ob eine Kultivierung der ME-9F1-positiven Zellen eine noch höhere Reinheit der LSEC ermöglicht.



### Abb. 3.28 FACS Messungen isolierter LSEC nach 24h Kultur

LSEC wurden mittels MACS Separation isoliert und sowohl direkt als auch nach 24h Kultur im FACS mit ME-9F1 FITC in FL-1 gegen FSC gemessen. Die elektronischen Fenster wurden, wie in Abb. 3.26A dargestellt, auf R1 und R2 eingestellt. Pro Ansatz wurden 10.000 Zellen aufgenommen. Dargestellt sind eine ungefärbte Probe, die nichtparenchymale Fraktion und das MACS Eluat. In den rechten unteren Quadranten ist der prozentuale Anteil der positiven Zellen vermerkt.

Wie in Abb. 3.28 zu sehen, ergab eine 24-stündige Kultivierung nur eine minimale Erhöhung der Reinheit der LSEC gegenüber den nicht kultivierten Zellen. Demzufolge war es für alle späteren Versuche nicht notwendig, die MACS-aufgereinigten ME-9F1<sup>+</sup> Zellen zu kultivieren. Falls jedoch trotzdem eine Kultivierung der LSEC an die Aufreinigung angeschlossen wurde, ist dies speziell vermerkt.

### 3.7.3 Reinheitsbestimmung der LSEC

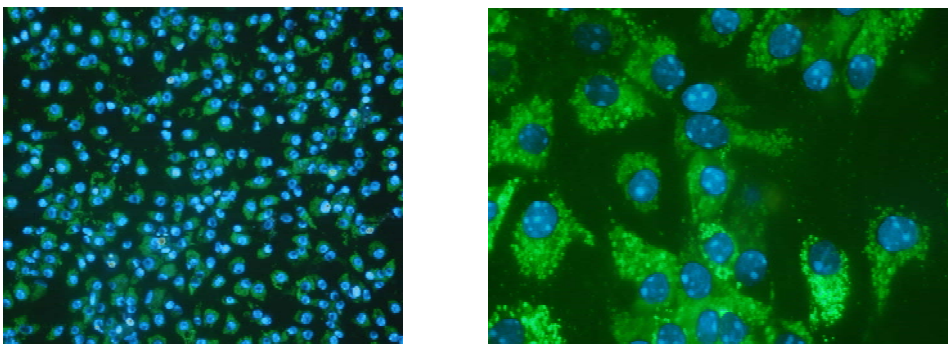
Der ME-9F1 Klon wird als ein Ak beschrieben, der spezifisch für LSEC und glatte Muskelzellen ist (1.9.3). Um die Reinheit der MACS-isolierten ME-9F1-positiven Fraktion zu überprüfen, werden die Zellen phänotypisch sowohl im Fluoreszenzmikroskop als auch in FACS Färbungen kontrolliert.

#### 3.7.3.1 Reinheitsbestimmung mit acetyliertem *low density lipoprotein*

Zur Kontrolle der Reinheit wurden die ME-9F1-positiven LSEC mit acetyliertem *low density lipoprotein* (AcLDL) inkubiert. AcLDL kann von Makrophagen (Kupffer Zellen) und Endothelzellen (LSEC), welche „scavenger“ Rezeptoren spezifisch für modifiziertes LDL besitzen, aufgenommen werden (Brown et al., 1979; Brown et al., 1980). Die Aufnahme von AcLDL ist in den Kupffer Zellen im Gegensatz zu den Endothelzellen allerdings sehr viel schwächer (Blomhoff et al., 1984). Mit diesem Test werden routinemäßig primäre Endothelzellkulturen auf ihre Reinheit getestet (Voyta et al., 1984).

Eine genaue Unterscheidung zwischen Kupfferzellen und LSEC, welche beide AcLDL aufnehmen können, kann, wie oben beschrieben, mit dieser Untersuchung allerdings nicht getroffen werden. Die Unterscheidung zwischen LSEC und Kupffer Zellen erfolgt in späteren Untersuchungen nach DNA Isolierung auf genomischer Ebene durch die Quantifizierung des Anteils *tdy*-positiver Zellen (1.9.3). Bedingt durch die getrenntgeschlechtliche syngene KMT mit männlichen Spendern und weiblichen Empfängern sind alle stromal/parenchymalen Zellen wie LSEC *tdy*-negativ, alle Zellen hämatopoetischen Ursprungs wie Kupffer Zellen *tdy*-positiv. Von den Kupffer Zellen abgesehen kann mit diesem Versuch jedoch eine Kontamination mit Hepatozyten, Lymphozyten, Fibroblasten und glatten Muskelzellen, die kein AcLDL aufnehmen können, ausgeschlossen werden.

Um die Reinheit der isolierten LSEC zu kontrollieren, wurden diese mit AcLDL inkubiert und im Fluoreszenzmikroskop analysiert (Abb. 3.29). Wie in der rechten Abbildung zu erkennen, waren die in diesem Ausschnitt dargestellten Zellen alle positiv für AcLDL. Eine Auszählung der Zellen in der linken Abb. ergab eine Gesamtzellzahl von 331, wovon 20 Zellen negativ und 311 Zellen positiv für AcLDL waren. Dies bedeutet, dass sich in der hier dargestellten Kultur 6% AcLDL-negative und 94% AcLDL-positive Zellen befanden.

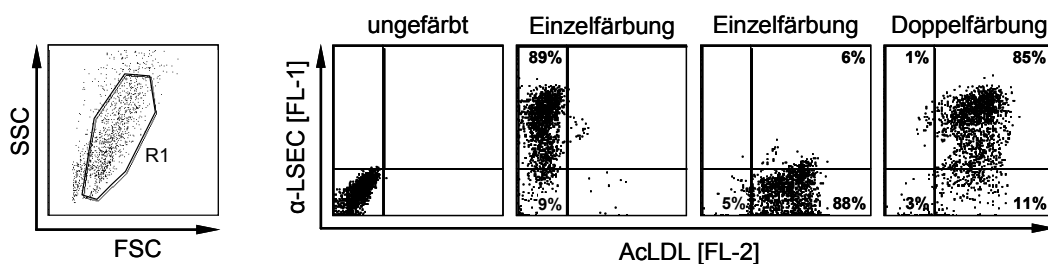


**Abb. 3.29 Nachweis von AcLDL in isolierten ME-9F1-positiven Zellen mittels Immunfluoreszenz**  
LSEC wurden auf Deckgläschen ausgesät und für 24h kultiviert. Danach erfolgte die Zugabe von BODIPY<sup>®</sup> FL-markiertem AcLDL. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen fixiert und die Kerne

mit Hoechst 33342 gefärbt. Die anschließende Kontrolle der positiven Zellen erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die Zellkerne sind blau, aufgenommenes AcLDL grün gefärbt.

### 3.7.3.2 Reinheitsbestimmung ME-9F1-positiver Zellen im FACS

Um das in Kapitel 3.7.3.1 dargestellte Ergebnis auch im FACS zu verifizieren, wurden aus nichtparenchymalen Zellen zweier nicht infizierter Mäuse LSEC mittels MACS Separation mit  $\alpha$ -LSEC *Micro-Beads* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) isoliert. Der eingesetzte Ak ist identisch mit dem vorher verwendeten ME-9F1 Klon, besitzt aber den Vorteil, direkt an paramagnetische *Beads* gekoppelt zu sein. Die isolierten LSEC wurden mit Dil-markiertem AcLDL inkubiert und anschließend im FACS analysiert. Die Ergebnisse der Färbungen sind in Abb. 3.30 dargestellt.



**Abb. 3.30 FACS Analyse isolierter LSEC mit ME-9F1 und AcLDL**

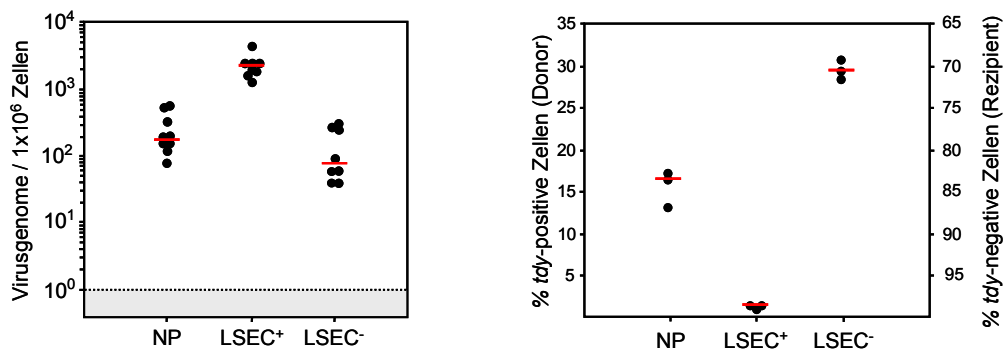
LSEC wurden durch MACS Separation mit  $\alpha$ -LSEC *Micro-Beads* isoliert und für 30min mit AcLDL inkubiert. Nach Inkubation erfolgte die Färbung mit  $\alpha$ -LSEC FITC Ak. AcLDL war mit dem Carbocyanin Fluorochrom Dil markiert. Auf R1 eingestellt wurden ungefärbte, einzeln mit  $\alpha$ -LSEC FITC [FL-1] und Dil AcLDL [FL-2] und doppelt [FL-1+FL-2] gefärbte LSEC gemessen. In den Quadranten ist der jeweilige Prozentsatz positiver Zellen vermerkt. Für jede Färbung wurden 30.000 Zellen aufgenommen.

Wie im FACS eindeutig zu sehen, waren die isolierten LSEC schon nach 30 Minuten Inkubation mit AcLDL ausreichend gefärbt. Durch die Doppelfärbung der LSEC mit AcLDL und  $\alpha$ -LSEC konnte gezeigt werden, dass die LSEC Population zu 85% rein ist. Im Gegensatz zu den Immunfluoreszenzanalysen in Abb. 3.29 kann im FACS eine Unterscheidung zwischen LSEC und Kupffer Zellen getroffen werden, da Kupffer Zellen ME-9F1-negativ sind. Damit konnte der in 3.7.3.1 durchgeführte Reinheitstest noch einmal bestätigt werden, da auch hier der Großteil der isolierten ME-9F1-positiven Zellen AcLDL aufgenommen hatte.

Wie unter 3.7 beschrieben, ist der ME-9F1 Ak spezifisch für Endothelzellen und glatte Muskelzellen (Harder et al., 1991). Eine Methode, um zwischen Endothel- und glatten Muskelzellen zu differenzieren, ist die Inkubation der isolierten Zellen mit AcLDL, denn glatte Muskelzellen nehmen kein AcLDL auf (Voyta et al., 1984; Ricousse-Roussanne et al., 2004). Wie in der Doppelfärbung mit AcLDL und  $\alpha$ -LSEC in Abb. 3.30 eindeutig gezeigt werden konnte, sind 96% der isolierten Zellen positiv für AcLDL, womit bewiesen ist, dass es sich bei den isolierten Zellen um LSEC und nicht um glatte Muskelzellen handelt (siehe auch 3.7.6). Die ME-9F1-positiven/AcLDL-negativen glatten Muskelzellen befinden sich in Abb. 3.30 im linken oberen Quadranten und stellen mit nur 1% der LSEC-Gesamtpopulation eine sehr geringe Kontamination dar.

### 3.7.4 Quantifizierung viraler Genome aus isolierten ME-9F1<sup>+</sup> Zellen

Nachdem gezeigt wurde, dass durch MACS Aufreinigung mit dem ME-9F1 Klon spezifisch LSEC isoliert werden können, erfolgte eine Aufreinigung der LSEC aus latent infizierten Tieren zur Bestimmung der viralen DNA *Load* und des Anteils *tdy*-positiver Zellen. Dazu wurden aus der nichtparenchymalen Fraktion von 3 Lebern latent infizierter Mäuse mittels MACS Separation ME-9F1<sup>+</sup> und ME-9F1<sup>-</sup> Zellen isoliert. Obwohl unter 3.7.2 gezeigt werden konnte, dass eine Kultivierung nur eine minimale Anreicherung ME-9F1-positiver Zellen bewirkt, wurden die isolierten Fraktionen kultiviert, da sich eine Kultivierung nicht negativ auf die Zellen auswirkt. Die aus den Kulturen aufgereinigte DNA wurde anschließend in die qPCR eingesetzt, um die Anzahl viraler Genome und den Anteil *tdy*-positiver Zellen zu quantifizieren (Abb. 3.31).



**Abb. 3.31 Quantifizierung der viralen DNA *Load* aus isolierten ME-9F1<sup>+</sup> LSEC**

Durch MACS Separation wurden die ME-9F1-positiven LSEC (LSEC<sup>+</sup>) aus den nichtparenchymalen Leberzellen von 3 latent infizierten Mäusen isoliert und für 24h kultiviert. Der Durchfluss der MACS Aufreinigung (LSEC<sup>-</sup>) wurde ebenfalls kultiviert. Anschließend wurde aus allen Ansätzen die DNA isoliert. Diese wurde in eine *M55/gB*- und *p<sub>thrp</sub>*-spezifische qPCR zur Quantifizierung der viralen DNA *Load* und in eine *tdy*- und *p<sub>thrp</sub>*-spezifische qPCR zur Quantifizierung des Anteils *tdy*-positiver Zellen eingesetzt. Als Standard diente das Plasmid pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy. *M55/gB* wurde als Triplikat in drei unabhängigen Quantifizierungen (linke Abb.) und *tdy* als Triplikat in einer Quantifizierung (rechte Abb.) gemessen. Dargestellt sind alle Werte (schwarz) und die jeweiligen Mediane (rot). Die Anzahl viraler Genome ist auf 1x10<sup>6</sup> Zellen normiert. NP: nichtparenchymale Zellen.

Um zunächst die virale DNA *Load* in der gesamten nichtparenchymalen Zellfraktion zu quantifizieren, wurde direkt nach Isolierung der nichtparenchymalen Zellen ein Aliquot der Zellen verwendet, um DNA zu gewinnen. Diese aufgereinigte DNA wurde ebenfalls in die oben beschriebene qPCR eingesetzt (NP). Wie in Abb. 3.31 deutlich zu sehen ist, erhöhte sich die Anzahl der viralen Genome in der LSEC<sup>+</sup> Fraktion um eine log<sub>10</sub> Stufe von 2x10<sup>2</sup> auf 2x10<sup>3</sup> Virusgenome pro 1x10<sup>6</sup> Zellen gegenüber der nichtparenchymalen Fraktion. Allerdings waren auch in der negativen Fraktion noch Virusgenome (8x10<sup>1</sup> pro 1x10<sup>6</sup> Zellen) nachweisbar.

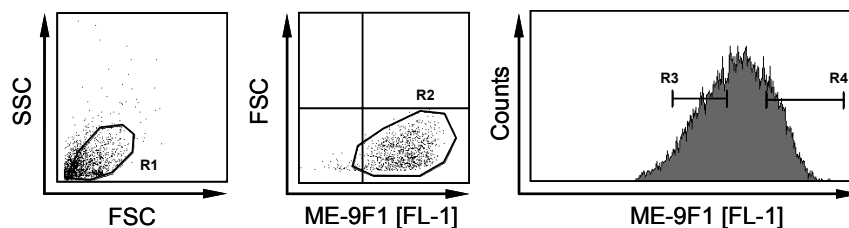
Parallel zur Anreicherung viraler Genome in der ME-9F1-positiven Fraktion nahm, da die LSEC als stromale Zellen nicht hämatopoetischen Ursprungs sind, die Zahl der *tdy*-positiven Zellen von ursprünglich 15% in der nichtparenchymalen Fraktion auf 1-2% in der Kultur der ME-9F1-positiven Zellfraktion sehr stark ab. Im Gegensatz dazu konnte in der LSEC<sup>-</sup> Fraktion ein Anstieg *tdy*-positiver Zellen auf 30% beobachtet werden. Da folglich die restlichen 70% der Zellen *tdy*-negativ, also stromal/parenchymalen Ursprungs sind, musste

sich im Durchfluss der MACS Separation (LSEC) noch ein großer Teil der LSEC befunden haben, was möglicherweise auf eine suboptimale Separation zurückzuführen ist. Diese nicht quantitative Separation der LSEC von den restlichen nichtparenchymalen Zellen stellt allerdings eine Erklärung für den Nachweis viraler Genome in der LSEC<sup>-</sup> Fraktion dar.

### 3.7.5 Isolierung von ME-9F1<sup>high</sup> und ME-9F1<sup>low</sup> LSEC

Nachdem in der ME-9F1-positiven Fraktion eine Anreicherung viraler Genome nachgewiesen werden konnte, sollte untersucht werden, ob sich latent infizierte Zellen gleichmäßig über die gesamte LSEC Population verteilen oder ob sie sich nur in bestimmten Subpopulationen finden lassen. Dazu wurde die LSEC Population aufgrund der Expressionsvarianz von Oberflächenrezeptoren in ME-9F1<sup>high</sup> und ME-9F1<sup>low</sup> aufgetrennt. Diese beiden Fraktionen wurden mittels eines Zellsorters zytofluorometrisch voneinander getrennt und in ihnen die Anzahl viraler Genome quantifiziert.

Für diesen Versuch wurden aus Lebern von drei latent infizierten Mäusen die nichtparenchymalen Zellen isoliert und mittels MACS Separation die LSEC angereichert. Sowohl von der Gesamtheit der nichtparenchymalen Zellen (inklusive LSEC) als auch von den LSEC wurde jeweils ein Aliquot für eine spätere DNA Aufreinigung entnommen und die restlichen Zellen in die zytofluorometrische Trennung eingesetzt (2.12.2). Wie in Abb. 3.32 dargestellt, wurden zwei Separationen durchgeführt: einmal auf ME-9F1<sup>low</sup> (R3) und einmal auf ME-9F1<sup>high</sup> (R4).



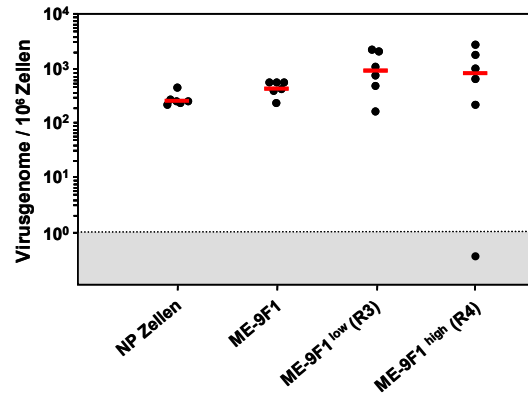
#### Abb. 3.32 Zytofluorometrische Trennung von ME-9F1<sup>high</sup> und ME-9F1<sup>low</sup> LSEC

Aus drei Lebern latent infizierter Tiere wurden mittels MACS Separation mit ME-9F1 FITC und  $\alpha$ -FITC *Micro-Beads* ME-9F1-positive LSEC isoliert. Die zytofluorometrische Trennung in ME-9F1<sup>low</sup> (R3) und ME-9F1<sup>high</sup> (R4) LSEC erfolgte aus der Population der durch die elektronischen Fenster R1 und R2 getäteten LSEC.

Aus den MACS-separierten und zytofluorometrisch getrennten Fraktionen wurde DNA isoliert, die in eine *M55/gB*- und *pThrp*-spezifische qPCR eingesetzt wurde, um die virale DNA *Load* zu quantifizieren (Abb. 3.33). Auch hier kam es zu einer Erhöhung der viralen DNA *Load* von  $2,5 \times 10^2$  viralen Genomen pro  $1 \times 10^6$  Zellen in der gesamten nichtparenchymalen Fraktion (inklusive LSEC) auf  $4 \times 10^2$  Virusgenome pro  $1 \times 10^6$  Zellen in der ME-9F1<sup>+</sup> Fraktion (siehe auch Abb. 3.31).

Die virale DNA *Load* war mit  $1 \times 10^3$  Genomen pro  $1 \times 10^6$  Zellen in den ME-9F1<sup>low</sup> (R3) und ME-9F1<sup>high</sup> (R4) Fraktionen (Abb. 3.32) gleich hoch. Demzufolge gab es keine Präferenz der Anreicherung viraler Genome in der ME-9F1<sup>low</sup> oder der ME-9F1<sup>high</sup> Fraktion. Damit konnte bewiesen werden, dass das latente virale Genom gleichmäßig über die getestete Population der ME-9F1-positiven Zellen verteilt ist.





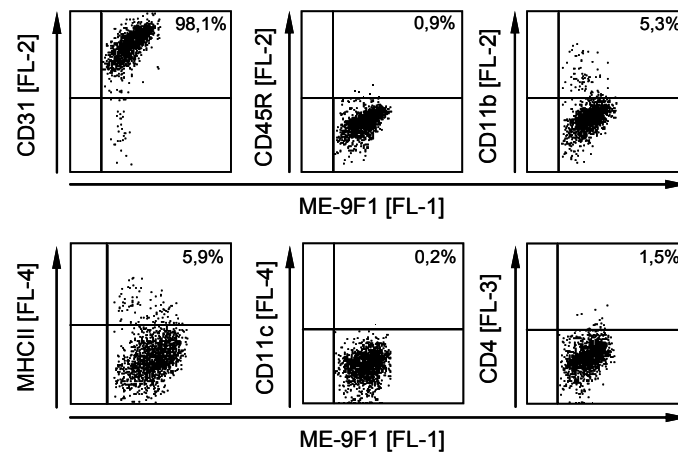
**Abb. 3.33 Quantifizierung der viralen DNA Load aus ME-9F1<sup>low</sup> und ME-9F1<sup>high</sup> LSEC**

Aus den MACS-separierten, bzw. zytofluorometrisch getrennten Fraktionen wurde DNA isoliert und in eine *M55/gB*- und *pthrp*-spezifische qPCR eingesetzt, um die virale DNA Load zu quantifizieren. Als Standard diente das Plasmid pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy. Alle Ansätze wurden als Triplikate in zwei unabhängigen Quantifizierungen analysiert. Dargestellt sind alle auf  $1 \times 10^6$  Zellen normierten Werte (schwarz) und die jeweiligen Mediane (rot). Hellgrau unterlegt sind alle Ansätze, in welchen nach 50 PCR Zyklen keine virale DNA nachweisbar war. Die zytofluorometrischen Trennungen aus Abb. 3.32 sind wie folgt dargestellt: ME-9F1<sup>low</sup> (R3) und ME-9F1<sup>high</sup> (R4).

### 3.7.6 Charakterisierung der Oberflächenrezeptoren auf isolierten LSEC

Um die mit dem ME-9F1 Ak isolierte LSEC Population genauer zu charakterisieren, wurden die MACS-isolierten ME-9F1-positiven Zellen auf Expression verschiedener Oberflächenmarker untersucht. In der Literatur (Übersicht: Knolle & Limmer, 2003a) werden LSEC als mikrovaskuläre Endothelzellen beschrieben, die einen einzigartigen Phänotyp im Vergleich zu mikrovaskulären Endothelzellen anderer Organe besitzen. So konnten beispielsweise CD31 (Katz et al., 2004), CD106 (Scoazec & Feldmann, 1994), MHC Klasse II (Rubinstein et al., 1986), CD4 (Scoazec & Feldmann, 1990) und CD11c (Knolle et al., 1999) Expressionen verschiedener Stärke auf den LSEC nachgewiesen werden, wobei CD31 am stärksten exprimiert wird (Übersicht: Knolle & Limmer, 2003a).

Zur FACS Analyse der in der Literatur beschriebenen Oberflächenmoleküle wurden MACS-isolierte ME-9F1-positiv LSEC aus 3 Lebern nicht infizierter Mäuse verwendet, die mit den entsprechenden Ak (siehe Tab.3.1) gefärbt wurden. Folgende fluoreszenzmarkierte Ak wurden getestet: CD31, CD11b, CD11c, MHC Klasse II, CD45R und CD4. In die FACS Messungen wurde der CD106 Ak nicht mehr eingesetzt, da in der gesamten nichtparenchymalen Zellfraktion, wie unter 3.6.1 gezeigt, nur eine sehr schwache CD106 Expression nachgewiesen werden konnte. Alle eingesetzten Ak wurden jeweils als Doppelfärbung zusammen mit ME-9F1 FITC analysiert (Abb. 3.34).



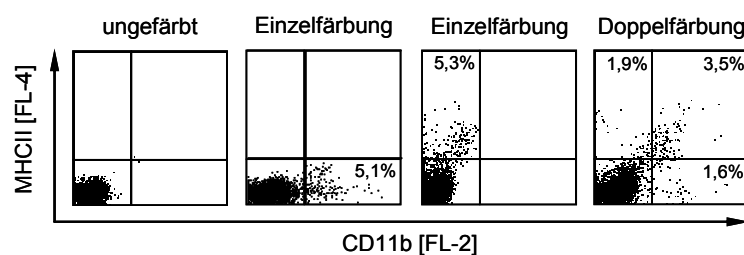
### Abb.3.34 Analyse der Oberflächenrezeptoren isolierter LSEC

LSEC wurden mit ME-9F1 FITC und  $\alpha$ -FITC *Micro-Beads* mittels MACS Separation isoliert und mit den entsprechenden Ak in Doppelfärbungen analysiert. Zur Doppelfärbung wurden CD31 PE, CD45R PE, CD11b PE, MHC Klasse II APC, CD11c APC und CD4 Cy mit ME-9F1 FITC gegengefärbt. Im rechten oberen Quadranten ist der prozentuale Anteil positiver Zellen vermerkt. Pro Messung wurden 20.000 Zellen analysiert.

Wie in Abb. 3.34 zu erkennen, waren entgegen der Literatur (Scoazec & Feldmann, 1990; Knolle et al., 1999) ME-9F1-positive Zellen direkt nach Separation negativ für CD11c und CD4. Die CD45R Messungen waren ebenfalls negativ. In der CD11b Fraktion konnten 5% positive Zellen nachgewiesen werden, der Anteil der positiven Zellen für MHC Klasse II lag bei 6%. Mit 98% waren LSEC fast ausnahmslos positiv für CD31.

Durch die CD31 Färbung konnte eindeutig ausgeschlossen werden, dass die isolierten LSEC mit glatten Muskelzellen kontaminiert waren, da glatte Muskelzellen im Gegensatz zu Endothelzellen CD31 nicht exprimieren (Yamashita et al., 2000; Ricousse-Roussanne et al., 2004). Dadurch konnten die unter 3.7.3 gewonnenen Ergebnisse, dass sich in den separierten ME-9F1 positiven Zellen keine glatten Muskelzellen befinden, noch einmal bestätigt werden.

Um zu überprüfen, ob die in Abb. 3.34 dargestellten positiven Populationen für CD11b und MHC Klasse II eine Population oder zwei distinkte Populationen sind, wurden isolierte LSEC mit MHC Klasse II APC und CD11b PE gefärbt und sowohl in Einzelfärbungen als auch in Doppelfärbungen im FACS analysiert (Abb. 3.35).



### Abb. 3.35 FACS Analysen für MHC Klasse II-positive und CD11b-positive LSEC

Isolierte LSEC nicht infizierter Mäuse wurden mit MHC Klasse II APC und CD11b PE gefärbt und im FACS gemessen. Dargestellt sind eine ungefärbte Probe, eine Einzelfärbung für CD11b, eine Einzelfärbung für MHC Klasse II und eine Doppelfärbung für CD11b und MHC Klasse II. Pro Ansatz

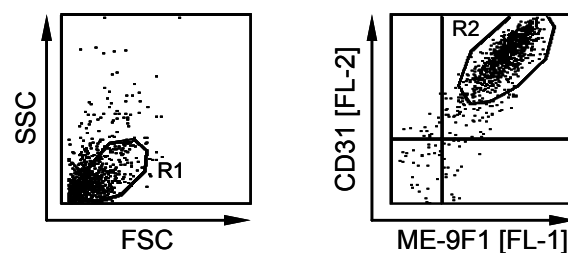
wurden 30.000 Zellen analysiert. Die Anteile der einfach und doppelt positiven Zellen sind in den jeweiligen Quadranten vermerkt.

Wie schon in Abb. 3.34 gezeigt, waren auch in diesen Messungen 5,1% CD11b-positive und 5,3% MHC Klasse II-positive LSEC in den Einzelfärbungen nachweisbar. In der Doppelfärbung wurden 1,9% MHC Klasse II-einfach positive, 1,6% CD11b-einfach positive und 3,5% MHC Klasse II/CD11b-doppelt positive Zellen gemessen. Aus der Doppelfärbung, in welcher die Summe der einfach und doppelt positiven Zellen 7% betrug, ließ sich ein Anteil von ungefähr 50% (3,5%) doppelt positiver und jeweils 25% (1,9% + 1,6%) einfach positiver Zellen für CD11b und MHC Klasse II errechnen. Damit konnte nachgewiesen werden, dass die Mehrheit der MHC Klasse II-positiven oder CD11b-positiven LSEC beide Oberflächenrezeptoren exprimieren.

### 3.7.7 Isolierung von ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> LSEC aus ME-9F1<sup>+</sup> Zellen

Nachdem gezeigt worden war, dass 98% der ME-9F1-positiven Zellen auch CD31-positiv sind (Abb. 3.34), wurden die ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> LSEC zytofluorometrisch isoliert. Diese Untersuchung sollte ausschließen, dass die latent infizierten Zellen der ME-9F1-positiven Zellpopulation in den verbleibenden 2% der ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup> Fraktion lokalisiert sind.

Dazu wurden aus den Lebern von 3 latent infizierten Tieren getrennt die nichtparenchymalen Zellen aufgereinigt und die LSEC isoliert. Von der nichtparenchymalen Zellfraktion vor der LSEC Separation und den LSEC wurde jeweils ein Aliquot Zellen zur späteren Quantifizierung der viralen DNA *Load* entnommen (Abb. 3.37). Die restlichen LSEC wurden mit CD31 PE gefärbt und alle ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> Zellen (R1+R2) zytofluorometrisch isoliert (Abb. 3.36).

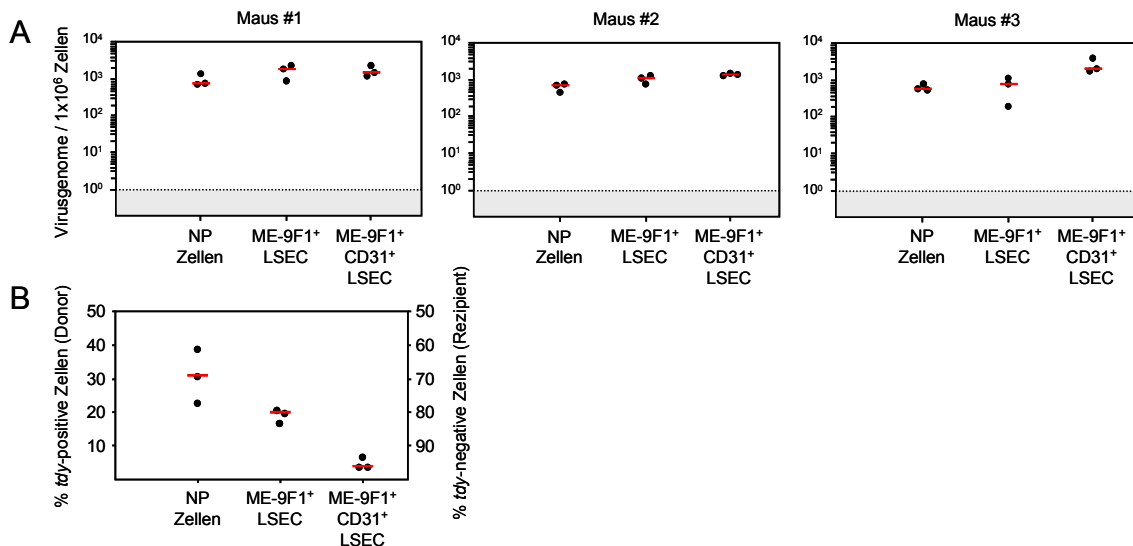


#### Abb. 3.36 Zytofluorometrische Trennung ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> LSEC

Aus nichtparenchymalen Zellen von Lebern dreier latent infizierter Mäuse wurden durch MACS Separation getrennt LSEC aufgereinigt und die ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> Zellen mit ME-9F1 FITC und CD31 PE zytofluorometrisch isoliert (R1+R2). Dargestellt ist die repräsentative Sort Analyse einer Maus.

Aus den nichtparenchymalen Zellen und den aufgereinigten LSEC wurde DNA isoliert, die in eine *M55/gB*-, *pthrp*- und *tdy*-spezifische qPCR eingesetzt wurde, um die Anzahl viraler Genome und den Anteil *tdy*-positiver Zellen zu quantifizieren (Abb. 3.37). In allen drei Ansätzen (Abb. 3.37A) konnte die virale DNA *Load* aus der nichtparenchymalen Fraktion mit 5 bis  $7 \times 10^2$  Virusgenomen pro  $1 \times 10^6$  Zellen durch Isolierung der LSEC auf 0,7 bis  $1,7 \times 10^3$  Virusgenome pro  $1 \times 10^6$  Zellen erhöht werden. Eine Erhöhung der viralen DNA *Load* in den ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> Zellen war nur bei Maus 3 sichtbar ( $2 \times 10^3$  Virusgenome pro  $1 \times 10^6$  Zellen),

bei Maus 1 und 2 änderte sich die virale DNA *Load* nicht ( $1,3 \times 10^3$  Virusgenome pro  $1 \times 10^6$  Zellen). Während in allen drei Zellfraktionen die Menge viraler Genome konstant blieb, nahm der Anteil *tdy*-positiver Zellen von 30% in der nichtparenchymalen Fraktion auf 20% in der LSEC Fraktion und 5% in den ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> LSEC ab (Abb. 3.37B). Damit konnte bewiesen werden, dass ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> LSEC nicht hämatopoetischen Ursprungs Träger latenter viraler Genome sind.



### Abb. 3.37 Quantifizierung der viralen DNA *Load* aus isolierten ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> LSEC

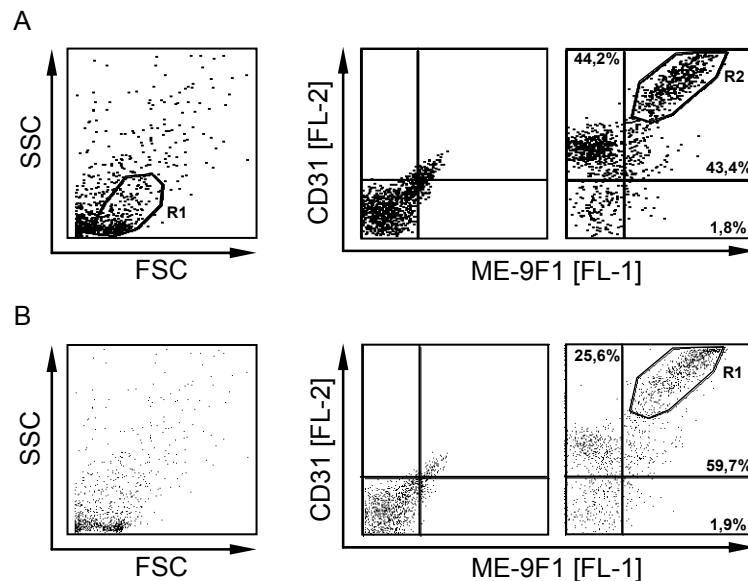
Isolierte DNA aus nichtparenchymalen Zellen (NP Zellen), gesamten ME-9F1-positiven LSEC und ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> LSEC wurde in eine *M55/gB*- und *pthrp*-spezifische qPCR zur Quantifizierung der viralen DNA *Load* und in eine *tdy*- und *pthrp*-spezifische qPCR zur Quantifizierung des Anteils *tdy*-positiver Zellen eingesetzt. Als Standard diente das Plasmid pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy. A: Quantifizierung der viralen DNA *Load* auf  $1 \times 10^6$  Zellen normiert. Dargestellt sind alle als Triplikate analysierten Ansätze (schwarz) der 3 Mäuse und ihre jeweiligen Mediane (rot). B: Anteil *tdy*-positiver Zellen. Dargestellt sind die Quantifizierungen aller drei Tiere in einem Diagramm (schwarz), der Median ist rot eingezeichnet.

## 3.7.8 Isolierung von ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> LSEC aus nichtparenchymalen Zellen

Die vorliegenden Ergebnisse belegen, dass in den ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> LSEC virale Genome nachweisbar waren, wobei die Menge viraler Genome aus ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> LSEC gegenüber den ME-9F1-positiven LSEC nicht abnahm. Falls die Population der LSEC innerhalb der nichtparenchymalen Fraktion der alleinige Träger latenter viraler Genome ist, wäre zu fordern, dass die Menge viraler Genome in ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup> Zellen der nichtparenchymalen Fraktion sehr stark reduziert, bzw. vollständig negativ ist.

Um diese Forderung zu überprüfen, wurden aus 3 Lebern latent infizierter Tiere separat nichtparenchymale Zellen aufgereinigt, aus welchen direkt ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> LSEC isoliert wurden. Von der nichtparenchymalen Zellfraktion wurde ein Aliquot Zellen entnommen, das zur initialen Quantifizierung der viralen DNA *Load* und des Anteils *tdy*-positiver Zellen verwendet wurde. Die restlichen nichtparenchymalen Zellen wurden mit ME-9F1 FITC und CD31 PE gefärbt und alle ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> Zellen zytofluorometrisch getrennt (Abb. 3.38).

In den vorherigen zytofluorometrischen Trennungen (3.7.5 und 3.7.7) war ein elektronisches Fenster (R1) gesetzt worden, um beschädigte Zellen oder Zellfragmente auszuschließen. Um zu überprüfen, ob die Menge latent infizierter Zellen durch die Definition von R1 verändert wird, wurden die isolierten nichtparenchymalen Zellen der 3 Mäuse jeweils geteilt, wobei die ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> LSEC der einen Hälfte mit den elektronischen Fenstern R1 und R2 (Abb. 3.38a) und der anderen Hälfte nur mit dem elektronischen Fenster R1 (Abb. 3.38b) zytofluorometrisch aufgereinigt wurden.



### Abb. 3.38 Isolierung ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> LSEC aus nichtparenchymalen Zellen

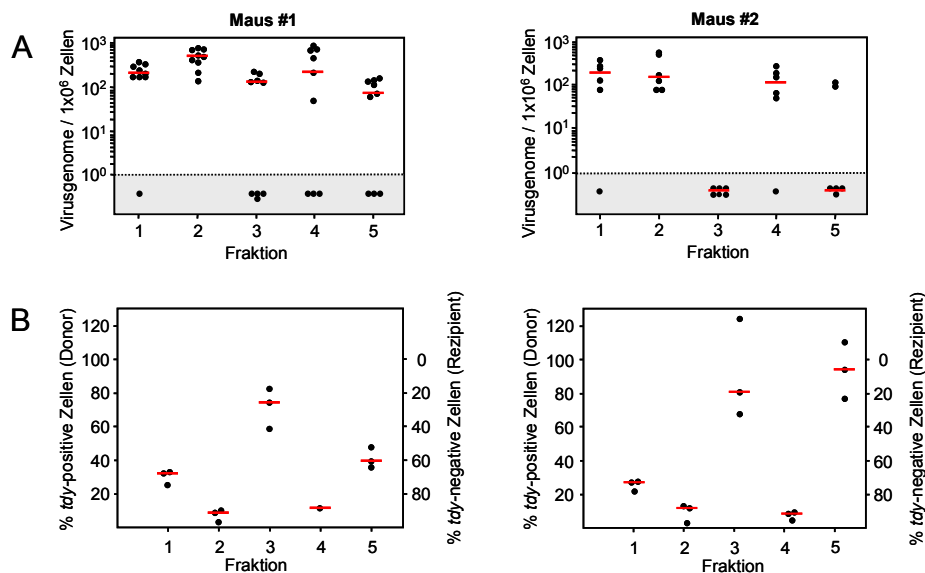
Aus drei Lebern latent infizierter Mäuse wurden getrennt nichtparenchymale Zellen aufgearbeitet. Die nichtparenchymalen Zellen wurden in die zytofluorometrische Trennung der ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> LSEC eingesetzt. A: Die eine Hälfte der nichtparenchymalen Zellen wurde im FSC/SSC Plot auf das elektronische Fenster R1 eingestellt. Aus den auf R1 eingestellten Zellen wurden die ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> LSEC durch das elektronische Fenster R2 isoliert. B: Für die zweite Hälfte der nichtparenchymalen Zellen wurde im FSC/SSC Fenster kein elektronisches Fenster gesetzt. Die ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> LSEC wurden ausschließlich aus dem elektronischen Fenster R1 isoliert.

Aus der Gesamtheit der nichtparenchymalen Zellen und den ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> LSEC wurde DNA isoliert, welche in eine *M55/gB*-, *pthrp*- und *tdy*-spezifische qPCR eingesetzt wurde, um die Anzahl viraler Genome und den Anteil *tdy*-positiver Zellen zu quantifizieren (Abb. 3.39). Die virale *Load* der Maus #3 war in der nichtparenchymalen Zellfraktion sehr gering und in den ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> LSEC negativ, daher ist das Ergebnis in den Abbildungen nicht dargestellt. Die Quantifizierungen der DNA nichtparenchymaler Zellen der anderen beiden Tiere ergab eine virale DNA *Load* von  $2 \times 10^2$  Genomen pro  $1 \times 10^6$  Zellen (Abb. 3.39A). In den ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> Zellen beider Ansätze, dargestellt in den Fraktionen 2 (R1; Abb. 3.38b) und 4 (R1 und R2; Abb. 3.38a), ist in Maus #1 eine leichte Erhöhung der viralen DNA *Load* auf 3,5 bis  $4 \times 10^2$  Genome pro  $1 \times 10^6$  Zellen zu erkennen, während die Anzahl viraler Genome in Maus #2 mit 1,2 bis  $1,7 \times 10^2$  Virusgenomen pro  $1 \times 10^6$  Zellen leicht abnahm.

Ein deutlicher Unterschied ist in den Fraktionen 3 und 5 erkennbar, welche die isolierten ME-9F1<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup> Zellen darstellen. In Maus #1 ist die Anzahl viraler Genome sehr stark reduziert ( $7 \times 10^1$  Genome pro  $1 \times 10^6$  Zellen), da die Trennung der einzelnen Fraktionen – wie auch in

den Quantifizierungen für *tdy* zu sehen - nicht quantitativ war und so noch virale Genome in der ME-9F1<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup> Fraktion nachweisbar waren. In Maus #2 sind beide Fraktionen negativ. Parallel dazu ist in den ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> Fraktionen eine starke Abnahme *tdy*-positiver Zellen auf 10% von ursprünglich 30% in der gesamten nichtparenchymalen Fraktion erkennbar, während die Anzahl *tdy*-positiver Zellen der ME-9F1<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup> Fraktion mit 40 bis 70% in Maus #1 und mit 80 bis 100% in Maus #2 zunahm (Abb. 3.39B).

Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, dass die Definition des hier dargestellten elektronischen Fensters um die ungefärbten Zellen (R1; Abb. 3.38a) keine Auswirkung auf die Menge der viralen Genome in einer Probe hatte. Ebenfalls konnte die Forderung, dass die Menge viraler Genome in der ME-9F1<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup> Fraktion sehr stark reduziert, bzw. vollständig negativ ist, erfüllt werden. Somit wurde bewiesen, dass die LSEC die alleinigen Träger latenter viraler Genome und somit innerhalb der gesamten nichtparenchymalen Fraktion der einzige latent infizierte Zelltyp sind.



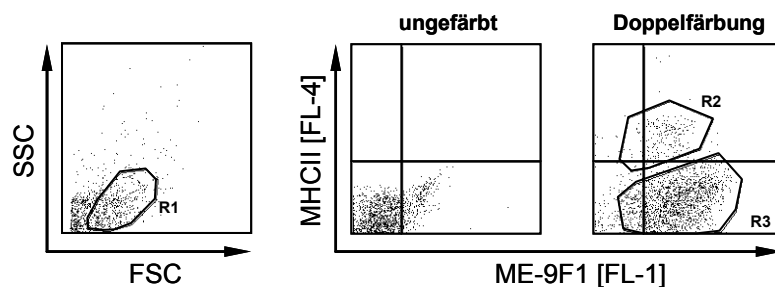
### Abb. 3.39 Quantifizierung der viralen DNA Load aus isolierten ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> LSEC

Isolierte DNA aus nichtparenchymalen Zellen und zytofluorometrischen Trennungen wurde jeweils in eine *M55/gB*- und *pThrp*-spezifische qPCR zur Quantifizierung der viralen DNA Load und in eine *tdy*- und *pThrp*-spezifische qPCR zur Quantifizierung des Anteils *tdy*-positiver Zellen eingesetzt. Als Standard diente das Plasmid pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy. Dargestellt sind die Quantifizierungen folgender Fraktionen: 1: nichtparenchymale Zellen, 2: ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> Zellen aus R1 (Abb. 3.38b), 3: ME-9F1<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup> Zellen aus nicht-R1 (Abb. 3.38b), 4: ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> Zellen aus R1+R2 (Abb. 3.38a) und ME-9F1<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup> Zellen aus R1 und nicht-R2 (Abb. 3.38a). A: Quantifizierung der viralen DNA Load auf 1x10<sup>6</sup> Zellen normiert. Alle Ansätze für Maus 1 wurden als Triplikate in 3 unabhängigen Quantifizierungen, alle Ansätze für Maus 2 als Triplikate in 2 unabhängigen Quantifizierungen dargestellt (schwarz) und der jeweilige Median eingezeichnet (rot). Hellgrau unterlegt sind alle Ansätze, in welchen nach 50 PCR Zyklen keine virale DNA detektierbar war. B: Anteil *tdy*-positiver Zellen. Quantifizierung in Triplikaten (schwarz) mit den jeweiligen Medianen (rot).

### 3.7.9 Trennung von ME-9F1<sup>+</sup>/MHC Klasse II<sup>+</sup> und ME-9F1<sup>+</sup>/MHC Klasse II<sup>-</sup> Zellen aus isolierten LSEC

Wie in den FACS Analysen unter 3.7.6 gezeigt werden konnte, waren ungefähr 6% der ME-9F1-positiven Zellen auch MHC Klasse II-positiv. Um zu überprüfen, ob sich latente virale Genome in der ME-9F1<sup>+</sup>/MHC Klasse II<sup>+</sup> Fraktion, in der ME-9F1<sup>+</sup>/MHC Klasse II<sup>-</sup> Fraktion oder in beiden Fraktionen nachweisen lassen, wurden isolierte LSEC zytofluorometrisch in ME-9F1<sup>+</sup>/MHC Klasse II<sup>-</sup> und ME-9F1<sup>+</sup>/MHC Klasse II<sup>+</sup> getrennt.

Für diesen Versuch wurden aus 3 Lebern latent infizierter Tiere getrennt nichtparenchymale Zellen aufgereinigt und LSEC isoliert. Von den aufgereinigten LSEC der drei Mäuse wurde jeweils ein Aliquot Zellen zur Quantifizierung der viralen DNA *Load* und des Anteils *tdy*-positiver Zellen verwendet. Die restlichen LSEC wurden zytofluorometrisch separiert in ME-9F1<sup>+</sup>/MHC Klasse II<sup>+</sup> (R1+R2) und ME-9F1<sup>+</sup>/MHC Klasse II<sup>-</sup> (R1+R3) Zellen (Abb. 3.40).

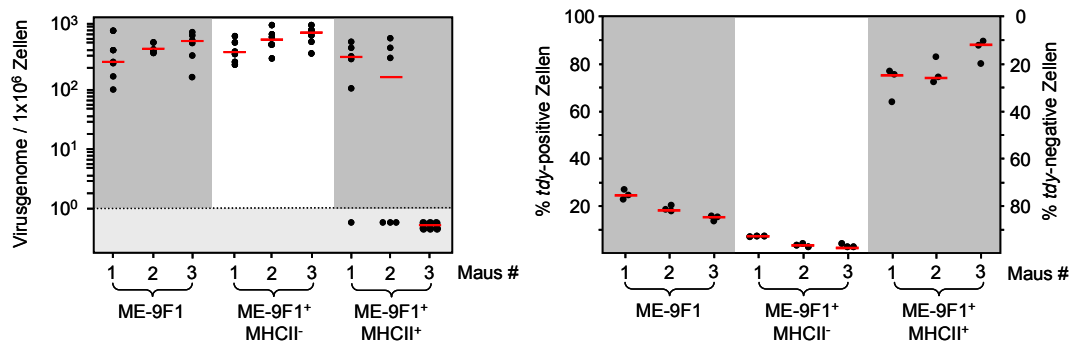


**Abb. 3.40 Trennung von ME-9F1<sup>+</sup>/MHC Klasse II<sup>+</sup> und ME-9F1<sup>+</sup>/MHC Klasse II<sup>-</sup> Zellen aus aufgereinigten LSEC**

Aus nichtparenchymalen Zellen von Lebern drei latent infizierter Mäuse wurden durch MACS Separation mit  $\alpha$ -LSEC *Micro-Beads* getrennt LSEC aufgereinigt. Diese wurden mit  $\alpha$ -LSEC FITC und MHC Klasse II APC gefärbt, auf das elektronische Fenster R1 eingestellt und zytofluorometrisch in ME-9F1<sup>+</sup>/MHC Klasse II<sup>-</sup> (R3) und ME-9F1<sup>+</sup>/MHC Klasse II<sup>+</sup> (R2) getrennt. Im ungefärbten Ansatz ist im rechten unteren Quadranten wieder die durch den Kollagenaseverdau bedingte Autofluoreszenz sichtbar. Dargestellt ist exemplarisch die Trennung der LSEC einer Maus.

Aus den aufgereinigten ME-9F1<sup>+</sup> LSEC und den zytofluorometrisch getrennten ME-9F1<sup>+</sup>/MHC Klasse II<sup>+</sup> und ME-9F1<sup>+</sup>/MHC Klasse II<sup>-</sup> LSEC wurde DNA isoliert, die in eine *M55/gB*-, *pthrp*- und *tdy*-spezifische qPCR eingesetzt wurde, um die Anzahl viraler Genome und den Anteil *tdy*-positiver Zellen zu quantifizieren (Abb. 3.41). Die Quantifizierung der aus den ME-9F1<sup>+</sup> LSEC isolierten DNA ergab für alle drei Tiere eine virale DNA *Load* von 2,5 bis  $5,5 \times 10^2$  Virusgenome pro  $1 \times 10^6$  Zellen. Die Anzahl der Virusgenome konnte durch die zytofluorometrische Trennung der ME-9F1<sup>+</sup>/MHC Klasse II<sup>-</sup> LSEC mit 3,5 bis  $7 \times 10^2$  Genomen pro  $1 \times 10^6$  Zellen noch leicht erhöht werden, während sie in der ME-9F1<sup>+</sup>/MHC Klasse II<sup>+</sup> LSEC abnahm und in einem Ansatz komplett negativ war (0 bis  $3 \times 10^2$  Genome pro  $1 \times 10^6$  Zellen). Interessanterweise nahm der Anteil *tdy*-positiver Zellen von ursprünglich 15 bis 25% in der ME-9F1<sup>+</sup> LSEC Fraktion auf 2 bis 7% in der ME-9F1<sup>+</sup>/MHC Klasse II<sup>-</sup> LSEC Fraktion ab, während in der ME-9F1<sup>+</sup>/MHC Klasse II<sup>+</sup> LSEC Fraktion ein Anstieg auf 75 bis 88% *tdy*-positiver Zellen zu erkennen war. Dies beweist, dass die ME-9F1<sup>+</sup>/MHC Klasse II<sup>+</sup> LSEC hämatopoetischen Ursprungs sind. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus vorherigen Versuchen, in welchen bewiesen werden konnte, dass Zellen hämatopoetischen

Ursprungs keine Träger latenter viraler Genome sind, war die Anzahl viraler Genome ebenfalls erniedrigt oder komplett negativ.



**Abb. 3.41 Quantifizierung der viralen DNA Load und des Anteils *tdy*-positiver Zellen aus ME-9F1<sup>+</sup>/MHC Klasse II<sup>+</sup> und ME-9F1<sup>+</sup>/MHC Klasse II<sup>-</sup> Fraktion**

Die isolierte DNA aus ME-9F1<sup>+</sup> LSEC, ME-9F1<sup>+</sup>/MHC Klasse II<sup>+</sup> LSEC und ME-9F1<sup>+</sup>/MHC Klasse II<sup>-</sup> LSEC wurde in eine *M55/gB*- und *pthrp*-spezifische qPCR zur Quantifizierung der viralen DNA Load (linke Abb.) und in eine *tdy*- und *pthrp*-spezifische qPCR zur Quantifizierung des Anteils *tdy*-positiver Zellen (rechte Abb.) eingesetzt. Als Standard diente das Plasmid pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy. Dargestellt sind die Quantifizierungen für ME-9F1<sup>+</sup>, ME-9F1<sup>+</sup>/MHC Klasse II<sup>-</sup> und ME-9F1<sup>+</sup>/MHC Klasse II<sup>+</sup> LSEC, jeweils für Maus 1, 2 und 3. In der linken Abb. ist die Anzahl viraler Genome auf 1x10<sup>6</sup> Zellen normiert, in der rechten Abb. der Anteil *tdy*-positiver Zellen dargestellt. Die Anzahl viraler Genome wurde als Triplikat in 2 unabhängigen Quantifizierungen und die Menge *tdy*-positiver Zellen als Triplikat in einer Quantifizierung bestimmt (schwarz). Die jeweiligen Mediane sind rot eingezeichnet. Hellgrau unterlegt sind alle Ansätze, in welchen nach 50 PCR Zyklen keine virale DNA detektierbar war.

#### Zusammenfassung:

LSEC (ME-9F1-positive Zellen) können spezifisch aus nichtparenchymalen Zellen mittels ME-9F1 bzw.  $\alpha$ -LSEC Ak isoliert werden. Innerhalb der gesamten nichtparenchymalen Zellpopulation sind die ME-9F1<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> LSEC der einzige latent infizierte Zelltyp. Da LSEC stromale Zellen nicht-hämatopoetischen Ursprungs sind, korreliert eine Anreicherung latent infizierter LSEC immer mit einer Abnahme *tdy*-positiver Zellen. LSEC können in eine majore Fraktion ME-9F1<sup>+</sup>/MHC Klasse II<sup>-</sup> Zellen nicht hämatopoetischen Ursprungs (*tdy*-negativ) und eine minore Fraktion ME-9F1<sup>+</sup>/MHC Klasse II<sup>+</sup> Zellen hämatopoetischen Ursprungs (*tdy*-positiv) getrennt werden. Dabei sind in der Subpopulation der ME-9F1<sup>+</sup>/MHC Klasse II<sup>-</sup> LSEC latente virale Genome nachweisbar, während die Menge viraler Genome in der Subpopulation der ME-9F1<sup>+</sup>/MHC Klasse II<sup>+</sup> LSEC stark reduziert, bzw. komplett negativ ist.

### 3.8 Bestimmung der Frequenz latent infizierter LSEC

Nachdem die LSEC als der latent infizierte Zelltyp in der Leber identifiziert werden konnten, erfolgte die Bestimmung der Frequenz latent infizierter LSEC. Dazu wurden LSEC isoliert, auf eine definierte Zellzahl eingestellt und titriert und die aus den einzelnen Titrationsstufen der jeweiligen Replikate isolierte DNA quantifiziert. Bei bekannter Anzahl negativer Replikate der seriellen Verdünnungen kann die MPN und das 95% Konfidenz-Intervall latent infizierter LSEC errechnet werden kann. Die MPN gibt die Anzahl latent infizierter LSEC pro 1x10<sup>6</sup> Zellen an, anhand derer bei bekannter viraler DNA Load die Anzahl viraler Genome in einer latent infizierten Zelle berechnet werden kann.



Für diesen Versuch wurden aus 3 Lebern latent infizierter Mäuse LSEC isoliert. Nach der Isolierung wurde die genaue Zellzahl bestimmt. Ein Aliquot der Zellen wurde entnommen und daraus die virale DNA *Load* quantifiziert, welche im Median  $6 \times 10^2$  Virusgenome pro  $1 \times 10^6$  Zellen ergab (Daten nicht gezeigt).

In einer früheren Arbeit wurde die virale DNA *Load* latent infizierter Makrophagen untersucht, welche auf 1 bis 10 virale Genome pro latent infizierte Zelle determiniert wurde (Pollock et al., 1997). Basierend auf dieser Genomzahlberechnung befinden sich im vorher quantifizierten Ansatz zwischen  $6 \times 10^1$  (bei 10 Genomen pro Zelle) und  $6 \times 10^2$  (bei 1 Genom pro Zelle) latent infizierte Zellen in  $1 \times 10^6$  Gesamtzellen. Dies bedeutet, dass sich maximal eine latent infizierte Zelle in  $1,67 \times 10^4$  Zellen und minimal eine latent infizierte Zelle in  $1,67 \times 10^3$  Zellen nachweisen lässt.

Die isolierten LSEC wurden auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und  $\log_2$  bis  $3,75 \times 10^3$  Zellen/ml titriert. Von jeder Titrationsstufe wurden 12 Replikate á 40  $\mu$ l entnommen. In der höchsten Konzentration wurden demzufolge pro Replikat  $8 \times 10^4$  Zellen, in der niedrigsten Konzentration  $1,5 \times 10^2$  Zellen eingesetzt. Aus den einzelnen Replikaten wurde DNA isoliert, wobei ab der Verdünnungsstufe von  $5 \times 10^3$  Zellen  $1 \mu$ g *Carrier* DNA pro Replikat dazugegeben wurde. Die aufgereinigten DNAs wurden anschließend gefällt (2.10.3) und in 5  $\mu$ l Tris-Puffer pH 8,0 pro Probe aufgenommen. Anschließend wurde jeweils der komplette Ansatz in eine *M55/gB*-spezifische qPCR eingesetzt und die Menge viraler Genome quantifiziert.

Ausgehend von oben beschriebener Annahme, dass sich eine latent infizierte Zelle pro  $1,67 \times 10^3$  bis  $1,67 \times 10^4$  Zellen befindet, wurden 12 Replikate der jeweiligen Titrationsstufen von  $2 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$  und  $2,5 \times 10^3$  Zellen quantifiziert. Die  $C_T$ -Werte sind in Tab 3.2 rechts und die absoluten Quantifizierungen viraler Genome aller Proben in Tab. 3.2 links dargestellt. Für die Berechnung der MPN wurden alle Ansätze, die in der absoluten Quantifizierung größer 0,5 waren, als positiv gewertet. Alle positiv definierten Replikate sind in Tab. 3.2 schwarz, alle negativen rot dargestellt. Damit ergibt sich folgende Verteilung negativer Ansätze: 7/12 für  $2 \times 10^4$  Zellen, 5/12 für  $1 \times 10^4$  Zellen, 8/12 für  $5 \times 10^3$  Zellen und 10/12 für  $2,5 \times 10^3$  Zellen.

Replikat	$2 \times 10^4$ Zellen	$1 \times 10^4$ Zellen	$5 \times 10^3$ Zellen	$2,5 \times 10^3$ Zellen
1	1,65x10 <sup>-3</sup>	1,77x10 <sup>0</sup>	0	0
2	1,17x10 <sup>0</sup>	0	7,05x10 <sup>-1</sup>	0
3	0	8,69x10 <sup>0</sup>	0	0
4	2,81x10 <sup>-1</sup>	8,05x10 <sup>-2</sup>	0	0
5	0	2,22x10 <sup>0</sup>	6,76x10 <sup>0</sup>	0
6	8,88x10 <sup>1</sup>	1,69x10 <sup>-1</sup>	0	0
7	2,2x10 <sup>-1</sup>	3,12x10 <sup>-1</sup>	2,64x10 <sup>0</sup>	0
8	0	6,31x10 <sup>1</sup>	0	0
9	6,57x10 <sup>0</sup>	4,08x10 <sup>-2</sup>	0	1,70x10 <sup>0</sup>
10	3,28x10 <sup>-2</sup>	1,46x10 <sup>1</sup>	5,44x10 <sup>0</sup>	0
11	1,43x10 <sup>0</sup>	7,22x10 <sup>0</sup>	0	0
12	3,5x10 <sup>0</sup>	1,37x10 <sup>0</sup>	0	5,59x10 <sup>0</sup>

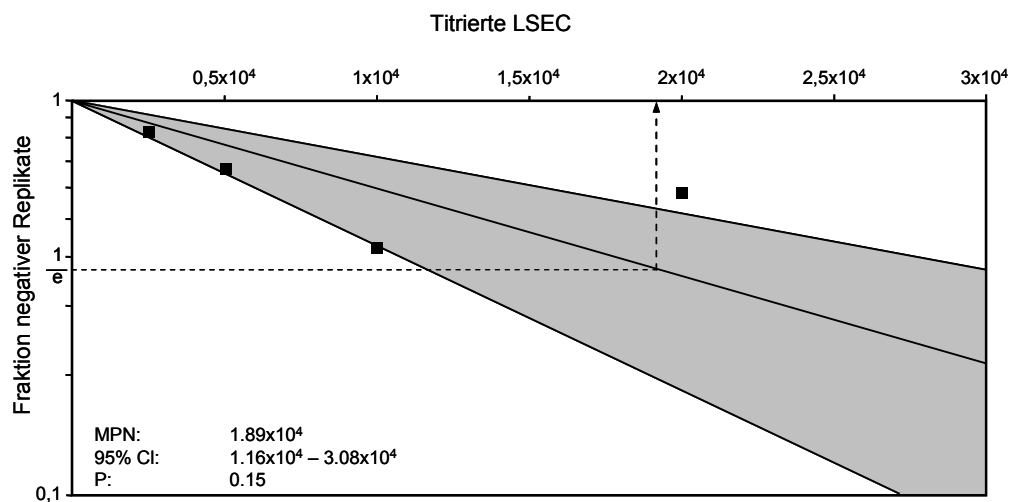
Replikat	$2 \times 10^4$ Zellen	$1 \times 10^4$ Zellen	$5 \times 10^3$ Zellen	$2,5 \times 10^3$ Zellen
1	47,63	37,73	50	50
2	38,31	50	39,03	50
3	50	35,47	50	50
4	40,34	42,11	50	50
5	50	37,40	35,82	50
6	32,17	41,06	50	50
7	40,68	40,19	37,16	50
8	50	32,65	50	50
9	35,87	43,08	50	37,78
10	43,39	34,73	36,13	50
11	38,03	35,73	50	50
12	36,76	38,09	50	36,09

**Tab. 3.2 Limiting dilution Quantifizierung latent infizierter LSEC**

LSEC wurden von  $2 \times 10^4$  bis  $2,5 \times 10^3$  Zellen pro Ansatz zu jeweils 12 Replikaten  $\log_2$  titriert und mittels *M55/gB*-spezifischer qPCR und dem Plasmid Standard pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy wurde die Anzahl viraler Genome quantifiziert. Die absoluten Werte der Quantifizierung aller 12 Replikate pro

Titrationstufen sind links dargestellt, die korrespondierenden  $C_T$ -Werte rechts. Positive Werte: schwarz, negative Werte: rot.

Aus der Anzahl negativer Replikate in Tab. 3.2 wurde die MPN latent infizierter LSEC berechnet (Abb. 3.42), welche einen Wert von  $1,89 \times 10^4$  ergab. Dies bedeutet, dass sich eine latent infizierte Zelle in  $1,89 \times 10^4$  LSEC, bzw. 53 latent infizierte Zellen in  $1 \times 10^6$  LSEC befinden. Die Grenzen des 95% Konfidenz-Intervalls lagen zwischen  $1,16 \times 10^4$  und  $3,08 \times 10^4$  Zellen, woraus sich Werte von 32 bis 86 latent infizierte Zellen pro  $1 \times 10^6$  LSEC errechnen. Mit der berechneten Anzahl latent infizierter Zellen und der bekannten viralen DNA *Load* kann abgeschätzt werden, wie viele virale Genome sich in einer latent infizierten Zelle befinden. Mit einer viralen DNA *Load* von  $6 \times 10^2$  Virusgenomen pro  $1 \times 10^6$  Zellen und 53 latent infizierten LSEC in  $1 \times 10^6$  Zellen befinden sich demzufolge 11 Virusgenome in einer latent infizierten Zelle mit einem Konfidenz-Intervall zwischen 7 und 19 Virusgenomen pro Zelle.



**Abb. 3.42 Limiting dilution Titration für isolierte LSEC**

Aus den Lebern von drei latent infizierten Mäusen wurden LSEC isoliert, auf eine definierte Zellzahl eingestellt und log2 titriert. Von den einzelnen Titrationstufen wurden jeweils 12 Replikate angefertigt. Aus den einzelnen Ansätzen wurde DNA isoliert und jeweils der komplette Ansatz in eine *M55/gB*-spezifische qPCR mit dem Plasmid pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy eingesetzt. Die experimentell bestimmte Anzahl negativer Replikate wurde in die *limiting dilution* Berechnung eingesetzt. Dargestellt sind die Titrationstufen von  $2 \times 10^4$  bis  $2,5 \times 10^3$  Zellen pro Ansatz. Aus der Verteilung der negativen Werte wurde eine MPN von  $1,89 \times 10^4$  mit einem 95% Konfidenz-Intervall (grau unterlegt) von  $1,16 \times 10^4$  bis  $3,08 \times 10^4$  errechnet.

#### Zusammenfassung:

Die Frequenz latent infizierter LSEC beträgt eine Zelle pro  $1,89 \times 10^4$  LSEC, wobei in einer latent infizierten Zelle zwischen 7 und 19 Virusgenome vorhanden sind.

### 3.9 Charakterisierung der Genexpression in der latent infizierten Leber und in LSEC

Nachdem die LSEC als eine Zellfraktion in der latent infizierten Leber identifiziert werden konnten, in welcher sich virale Genome nachweisen lassen, wurden Transkriptanalysen aus gesamter Leber und isolierten LSEC angeschlossen, um der Frage nachzugehen, ob die

nachgewiesenen viralen Genome funktionell und transkriptionell aktiv sind. In früheren Arbeiten wurden IE1 Transkripte in Lungen latent infizierter Mäuse detektiert, eine Expression des Transaktivatorgens *ie3* und nachgeschalteter Gene wie beispielsweise *M55/gB* konnte dagegen nicht nachgewiesen werden (Kurz et al., 1999).

Die virale Genexpression wurde in dieser Arbeit anhand verschiedener Markergene, spezifisch für die IE (*ie1*, *ie3*), die E (*e1*) und die E/L Phase (*M55/gB*), untersucht. Die Transkriptanalysen für die genannten Gene wurden absolut mittels RT-qPCR durchgeführt. In den Quantifizierungen wurden *in vitro* Transkripte definierter Menge als virale Standards eingesetzt. Mit Ausnahme von *gB*, welches keine Introns besitzt, wurden die Primer und Sonden für IE1, IE3 und E1 über die Intron-Exon Grenzen der jeweiligen Gene gelegt. Aus diesem Grund wurden Quantifizierungen für *gB* jeweils mit und ohne Reverse Transkriptase-(RT-) Schritt durchgeführt.

### 3.9.1 Klonierung und *in vitro* Transkription viraler Standards

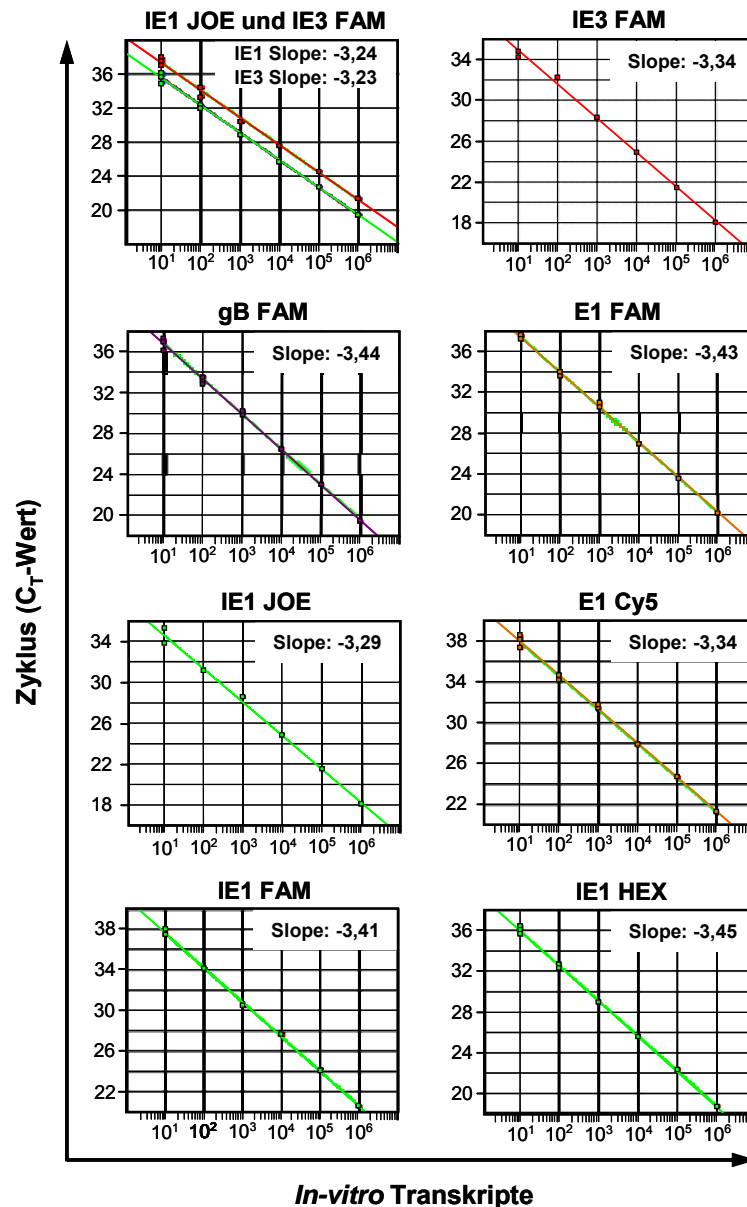
Für die Quantifizierungen von IE1, IE3 und *gB* wurden bereits vorhandene *in vitro* Transkripte verwendet (Kurz et al., 1999). Diese *in vitro* Transkripte wurden bisher nur zur Quantifizierung in Southern Blots nach vorheriger RT-PCR eingesetzt, deshalb mussten die entsprechenden RT-qPCRs noch optimiert werden. Das *in vitro* Transkript für E1 wurde neu kloniert und ist im Folgenden beschrieben.

Konfluente MEF wurden mit 0,2 PFU mCMV-wt pro Zelle zentrifugal (entspricht einer MOI von 4) infiziert (2.8.3) und aus jedem Ansatz 6 Stunden nach Infektion die Gesamt-RNA isoliert (2.11.2). Diese wurde als *template* in eine RT-PCR mit den Primern Early-1\_For1 (n'1891-1912; *Genbank Accession No.* 330453) und Early-1\_Rev1 (n'3797-3818; *Genbank Accession No.* 330453) eingesetzt, um ein cDNA Fragment des *e1* Gens amplifizieren (Bühler et al., 1990; Rawlinson et al; 1996; Ciocco-Schmitt et al., 2002). Im Gel waren zwei Fragmente zu detektieren, ein 1,5kbp großes Amplifikat (RNA ohne Introns) und ein 1,9kbp großes Amplifikat (DNA und ungespleißte RNA). Das 1,5kbp wurde nach Gelelution (2.10.6) mittels UA-basierter Ligation (2.10.10) in den pDrive Vektor (QIAGEN) kloniert und für eine anschließende *in vitro* Transkription zuvor mit *SphI* linearisiert (2.10.4). Die *in vitro* Transkriptionen für alle linearisierten Plasmide wurden nach Protokoll durchgeführt (2.11.3). Nach Bestimmung der Konzentration der *in vitro* Transkripte wurden diese auf eine definierte Teilchenzahl eingestellt (2.11.3.1).

### 3.9.2 Etablierungen von *Singleplex* und *Duplex* RT-qPCRs zum Nachweis viraler Transkripte

Nachdem alle *in vitro* Transkripte vorlagen, erfolgten die Etablierungen der RT-qPCRs auf beiden TaqMan Geräten. Analog zu den Etablierungen der qPCRs (3.1.2) wurden die Primer und TaqMan Sonden mit dem Programm Primer Express 2.0 ermittelt und mit  $\log_{10}$ -titrierten *in vitro* Transkripten getestet. Die Titrationsreihen wurden in RNase-freien Reaktionsgefäßen angesetzt, wobei ab der  $10^3$  Verdünnungsstufe zusätzlich noch  $2\mu\text{g}$  Poly-A<sup>+</sup> RNA (Roche, Mannheim) dazugegeben wurde, um unspezifische Bindungen der *in vitro* Transkripte an die

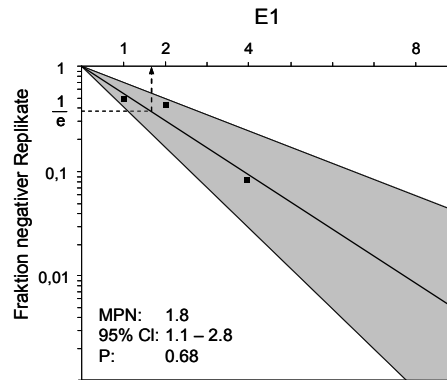
Gefäßwand zu verhindern. Aus den unter 2.9.1.3 und 2.9.1.4 beschriebenen Primerpaaren und Sonden erwiesen sich folgende Primer- und Sondenkombinationen als optimal: IE1\_Taq\_For1/Rev1 mit IE1\_Taq\_P1 (FAM, HEX und JOE markiert) für IE1, IE3\_Taq\_For2/Rev2 mit IE3\_Taq\_P1 (FAM markiert) für IE3, gB\_Taq\_For1/Rev1 mit gB\_Taq\_P1 (FAM markiert) für gB und E1\_Intron1\_For1/ E1\_Intron2\_Rev1 mit Early1\_Taq\_P2 (FAM und Cy5 markiert) für E1. Alle in die *Duplex* RT-qPCR eingesetzten Sonden waren mit einem Black Hole Quencher markiert, der im Gegensatz zu TAMRA keine Eigenfluoreszenz hat, die zur eine möglichen Überlappung mit Reporterfluoreszenzen führen kann (Wilson & Johansson, 2003). Die Standardkurven der *in vitro* Transkripte aller RT-qPCRs sind in Abb. 3.43 dargestellt. Die aus den Steigungen errechneten Amplifikationseffizienzen betragen für den *Duplex* Ansatz: IE1 JOE 103,5% und IE3 FAM 104% und für die *Singleplex* Ansätze: IE3 FAM 99,3%, gB FAM 95,3%, E1 FAM 95,7%, E1 Cy5 99,3%, IE1 JOE 101,3%, IE1 FAM 96,5% und IE1 HEX 94,9%. Hierbei wurde deutlich, dass bei gleich bleibenden Reaktionsbedingungen für die IE1 RT-qPCR zwischen den unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Sonden kleine Schwankungen in den Amplifikationseffizienzen auftreten können. Trotz der Schwankungen war auch hier die unter 3.1.2 beschriebene Forderung, dass die Amplifikationseffizienzen aller Ansätze über 90% liegen sollen, erfüllt.



**Abb. 3.43 Standardkurven für IE1, IE3, gB und E1 der RT-qPCR**

Die Auftragung der  $C_T$ -Werte gegen die korrespondierende Kopienzahl des *in vitro* Transkript-Standards führt zu den entsprechenden Standardkurven, in welchen alle *in vitro* Transkripte  $\log_{10}$  titriert waren. Folgende Titrationsreihen sind dargestellt: IE1 (grün) FAM, HEX und JOE markiert, IE3 (rot) FAM markiert, E1 (ocker) FAM und Cy5 markiert und gB (violett) FAM markiert. Alle *in vitro* Transkripte wurden im TaqMan 7500 von  $10^6$  bis  $10^1$  Teilchen titriert, wobei die  $10^2$  Titrationsen als Duplikate und die  $10^1$  Titrationsen als Triplikate quantifiziert wurden. Im ersten Diagramm sind die Standardkurven für IE1 und IE3 dargestellt, welche als *Duplex* Ansatz quantifiziert wurden. Die dazugehörigen Amplifikationsprofile aller Standards sind im Anhang in Abb. 6.3 dargestellt.

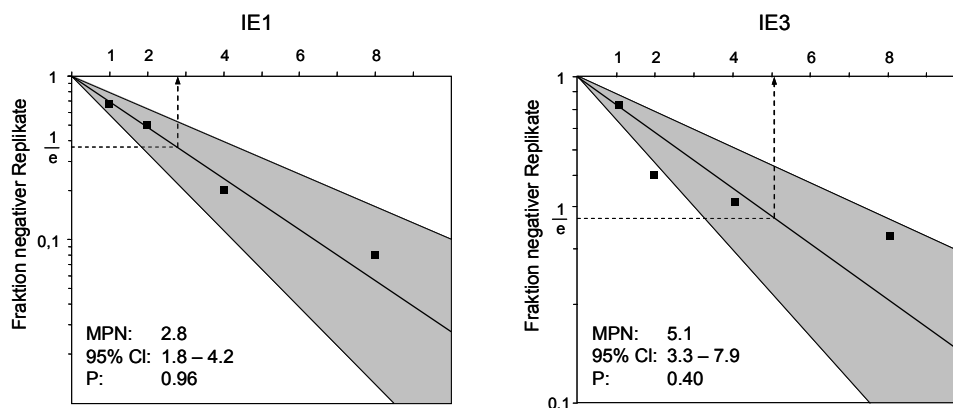
Die Bestimmungen der Sensitivitätsgrenzen für IE1, IE3 und gB im *Singleplex* Ansatz ergaben für IE1: 1,8, IE3: 1,4, und M55/gB: 0,8 Transkripte (Simon et al., 2006a). Das E1 *in vitro* Transkript wurde zur Bestimmung der Sensitivitätsgrenze von 8 Transkripten bis 1 Transkript titriert und jeweils 12 Replikate in eine E1-spezifische RT-qPCR eingesetzt. Für E1 ist das Detektionslimit in Abb. 3.44 dargestellt, das bei 1,8 Transkripten mit einem 95% Konfidenz-Intervall zwischen 1,1 und 2,8 Transkripten lag.



**Abb. 3.44 Sensitivität der E1-spezifischen RT-qPCR**

E1 *in vitro* Transkripte wurden titriert (8, 4, 2 Teilchen, 1 Teilchen) und zu jeweils 12 Replikaten in einer E1-spezifischen RT-qPCR im TaqMan 7500 analysiert. Die experimentell bestimmte Anzahl negativer Replikate wurde in die *limiting dilution* Berechnung eingesetzt. Aus dem Ansatz wurde eine MPN von 1,8 mit einem 95% Konfidenz-Intervall von 1,1 bis 2,8 Teilchen (grau unterlegt) bestimmt.

Für die neu etablierte IE1 und IE3 *Duplex* RT-qPCR wurden ebenfalls die Sensitivitätsgrenzen beider Transkripte bestimmt (Abb. 3.45). Dazu wurden IE1 und IE3 *in vitro* Transkripte getrennt titriert (8, 4, 2 Transkripte, 1 Transkript) und jeweils 12 Replikate in eine IE1- und IE3-spezifische *Duplex* RT-qPCR eingesetzt. Die MPN für IE1 lag bei 2,8 (Konfidenz-Intervall: 1,8-4,2), für IE3 bei 5,1 Teilchen (Konfidenz-Intervall: 3,3-7,9). Die Sensitivität des Nachweises für IE3 Transkripte war in diesem Ansatz etwas schlechter als die des Nachweises für IE1. Trotzdem konnte die Forderung der Detektion von mindestens 5 Teilchen noch erfüllt werden.



**Abb. 3.45 Sensitivitäten der IE1- und IE3-spezifischen Duplex RT-qPCR**

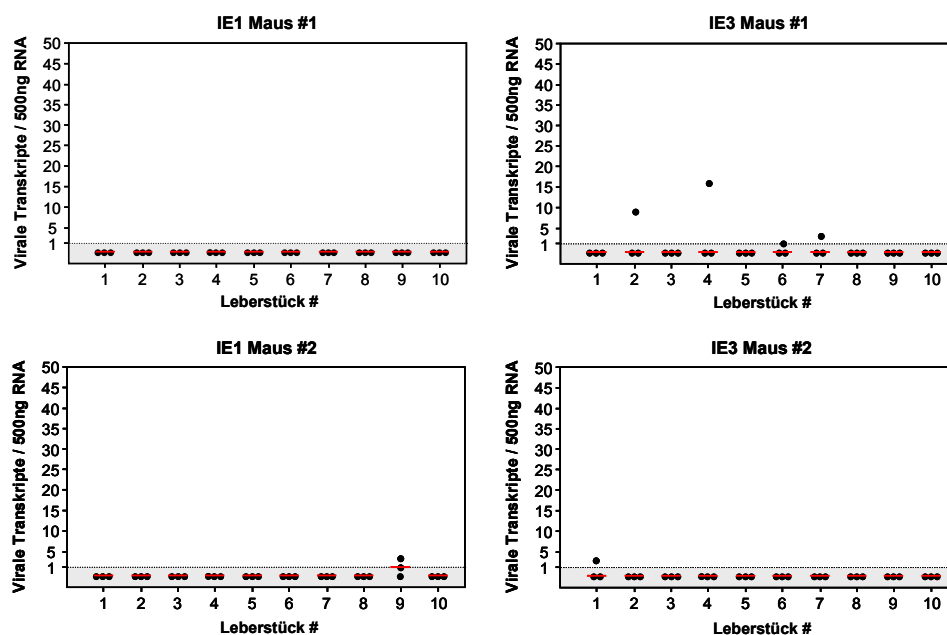
IE1 und IE3 *in vitro* Transkripte wurden titriert (8, 4, 2 Teilchen und 1 Teilchen) und zu jeweils 12 Replikaten in die IE1- und IE3-spezifische Duplex RT-qPCR eingesetzt. Die experimentell bestimmte Anzahl negativer Replikate wurde in die *limiting dilution* Berechnungen für IE1 (links) und IE3 (rechts) eingesetzt. Aus den Ansätzen wurde für IE1 eine MPN von 2,8 mit einem 95% Konfidenz-Intervall (grau unterlegt) von 1,8 bis 4,2 Teilchen und für IE3 eine MPN von 5,1 mit einem 95% Konfidenz-Intervall (grau unterlegt) von 3,3 bis 7,9 Teilchen errechnet.

### 3.9.3 Virale Genexpression in der Leber latent infizierter Mäuse

In früheren Arbeiten konnten IE1 Transkripte in RNA aus Lungen latent infizierter Mäuse nachgewiesen werden (Kurz et al., 1999; Kurz & Reddehase, 1999), dagegen wurden bisher

keine viralen Transkripte aus der Leber latent infizierter Mäuse detektiert (Koffron et al., 1998). Die Ergebnisse von Koffron et al. (1998) sollten im folgenden Versuch noch einmal überprüft werden, indem RNA aus gesamter Leber latent infizierter Mäuse auf Präsenz viraler IE1 und IE3 Transkripte getestet wird.

Dazu wurden aus jeweils 10 Leberstücken von 2 latent infizierten Mäusen Gesamt-RNA aufgereinigt und in eine IE1- und IE3-spezifische *Duplex* RT-qPCR eingesetzt. Vor der Quantifizierung wurde die virale DNA *Load* bestimmt, welche für Maus #1  $4 \times 10^1$  Virusgenome und für Maus #2  $2,5 \times 10^2$  Virusgenome pro  $1 \times 10^6$  Zellen ergab (Daten nicht gezeigt). In Abb. 3.46 ist die RNA Quantifizierung aus allen 10 Leberstücken beider Mäuse jeweils für IE1 und IE3 pro 500ng Gesamt-RNA dargestellt. Es wurden weder IE1- noch IE3-spezifische Transkripte detektiert, womit die Ergebnisse von Koffron et al. (1998) bestätigt werden konnten.



**Abb. 3.46 Detektion viraler Transkripte in der Leber latent infizierter Mäuse**

Aus zwei unterschiedlichen KMTs wurde jeweils einer Maus die Leber entnommen und in homogene Stücke geteilt. Aus 10 dieser Stücke wurde Gesamt-RNA aufgereinigt und in eine IE1- und IE3-spezifische *Duplex* RT-qPCR eingesetzt. Als Standard dienen *in vitro* Transkripte für IE1 und IE3. Alle Ansätze wurden als Triplikate quantifiziert und sind auf 500ng Gesamt-RNA bezogen dargestellt. Rot eingezeichnet sind die jeweiligen Mediane. Alle grau unterlegten Ansätze waren nach 50 PCR-Zyklen negativ.

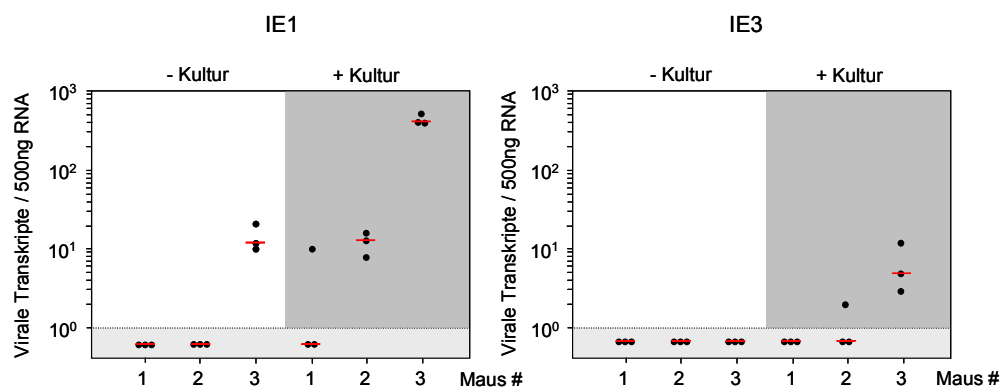
### 3.9.4 Virale Genexpression in latent infizierten LSEC

Die geringe Anzahl viraler Genome in der Leber latent infizierter Tiere bedingt möglicherweise, dass keine viralen Transkripte nachgewiesen werden können. Aus diesem Grund wurden aus Lebern latent infizierter Tiere LSEC aufgereinigt und auf Präsenz viraler Transkripte untersucht. Da gezeigt werden konnte, dass die LSEC Aufreinigung spezifisch die Menge latent infizierter Zellen erhöht, sollten in LSEC-positiven Fraktionen virale Transkripte nachweisbar sein.

Zu diesem Zweck wurden aus 3 latent infizierten Tieren getrennt LSEC isoliert und jeweils ein Aliquot Zellen ( $0,5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen) für eine DNA Isolierung zur Quantifizierung der

viralen DNA *Load* und des Anteils *tdy*-positiver Zellen entnommen. Die DNA Quantifizierung ergab bei Maus #1 eine virale DNA *Load* von  $4,2 \times 10^1$  Virusgenomen pro  $1 \times 10^6$  Zellen mit 11% *tdy*-positiven Zellen, für Maus #2 eine virale DNA *Load* von  $7,2 \times 10^1$  Genomen pro  $1 \times 10^6$  Zellen mit 12% *tdy*-positiven Zellen und für Maus #3 eine virale DNA *Load* von  $6,4 \times 10^1$  Genome pro  $1 \times 10^6$  Zellen mit 20% *tdy*-positiven Zellen (Daten nicht gezeigt).

Die verbleibende Menge an LSEC der drei Tiere wurde halbiert, aus jeweils einer Hälfte direkt Gesamt-RNA aufgereinigt und die andere Hälfte der LSEC für 24h in Kultur genommen. Nach Kultivierung wurde aus den LSEC der drei Mäuse ebenfalls Gesamt-RNA aufgereinigt. In allen Ansätzen wurde die RNA Konzentration gemessen und jeweils  $1/10$  des gesamten Eluats in eine IE1-, IE3- und E1-spezifische RT-qPCR eingesetzt. Die Quantifizierungen der IE1 und IE3 Transkripte sind in Abb. 3.47 dargestellt.



### Abb. 3.47 Virale Genexpression aus RNA isolierter LSEC

Mittels MACS Separation wurden aus 3 latent infizierten Mäusen LSEC isoliert und der jeweilige Ansatz halbiert. Aus der einen Hälfte der LSEC wurde direkt nach Separation Gesamt-RNA aufgereinigt (- Kultur, weiß unterlegt). Die andere Hälfte wurde für 24h in Kultur genommen um anschließend RNA zu isolieren (+ Kultur, dunkelgrau unterlegt). Aus allen Proben wurde die RNA Konzentration bestimmt und jeweils  $1/10$  des Gesamtansatzes in eine IE1- (links) und IE3-spezifische (rechts) RT-qPCR eingesetzt. Dargestellt ist die Menge der quantifizierten Transkripte normalisiert auf 500ng RNA. Die isolierte LSEC RNA eines jeden Tieres wurde als Triplikat quantifiziert und der jeweilige Median rot eingezeichnet. Hellgrau unterlegt sind alle Ansätze, in welchen nach 50 PCR Zyklen keine viralen Transkripte detektiert werden konnten.

In Abb. 3.47 ist deutlich zu erkennen, dass direkt nach LSEC Isolierung nur in Maus #3 IE1 Transkripte geringer Frequenz nachgewiesen werden konnten (12 Transkripte pro 500ng RNA), dagegen kein *splicing* zu IE3 erfolgt. Die Menge der IE1 Transkripte für Maus #3 erhöhte sich dagegen nach 24h Kultur auf  $4 \times 10^2$  Transkripte pro 500ng RNA. Ebenfalls konnten in Maus #2, in welcher direkt nach LSEC Isolierung keine IE Transkripte nachgewiesen wurden, nach 24h Kultivierung IE1 Transkripte detektiert werden (13 Transkripte pro 500ng RNA). In allen drei Mäusen waren die RT-qPCRs für IE3 direkt nach LSEC Isolierung negativ, dagegen konnten nach 24h Kultur in Maus #3 IE3 Transkripte detektiert werden (5 Transkripte pro 500ng RNA). Die Quantifizierungen für E1 waren in allen Ansätzen sowohl direkt nach Isolierung als auch nach 24h Kultur der LSEC negativ (Daten nicht gezeigt). Somit konnte eindeutig gezeigt werden, dass in isolierten LSEC, im Gegensatz zur gesamten Leber, virale Transkripte nachweisbar sind. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die virale Genexpression durch Kultivierung der isolierten LSEC induzierbar ist. Da in allen 3 getesteten Mäusen eine sehr geringe virale DNA *Load*



quantifiziert wurde, ist anzunehmen, dass in Tieren mit höherer viraler DNA *Load* auch mehr virale Transkripte in den LSEC nachzuweisen sind.

### 3.9.5 Induktion viraler Transkripte aus LSEC durch Histondeacetylase Inhibitoren

Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass die DNA latenter viraler Genome mit Histonen assoziiert ist und Modifikationen der Chromatinstruktur die virale Genexpression regulieren können (Kubat et al., 2004). Eine dieser Modifikationen betrifft die Acetylierung, bzw. die Deacetylierung der Lysinreste der Histone durch Histonacetyltransferasen (HAT), bzw. Histondeacetylasen (HDAC). Die durch Acetylierung der Histonreste geöffnete Chromatinstruktur ist transkriptionell aktiv, kann aber durch die HDAC-vermittelte Deacetylierung wieder kondensieren und somit in die transkriptionell inaktive Form übergehen (Übersicht: Grant, 2001).

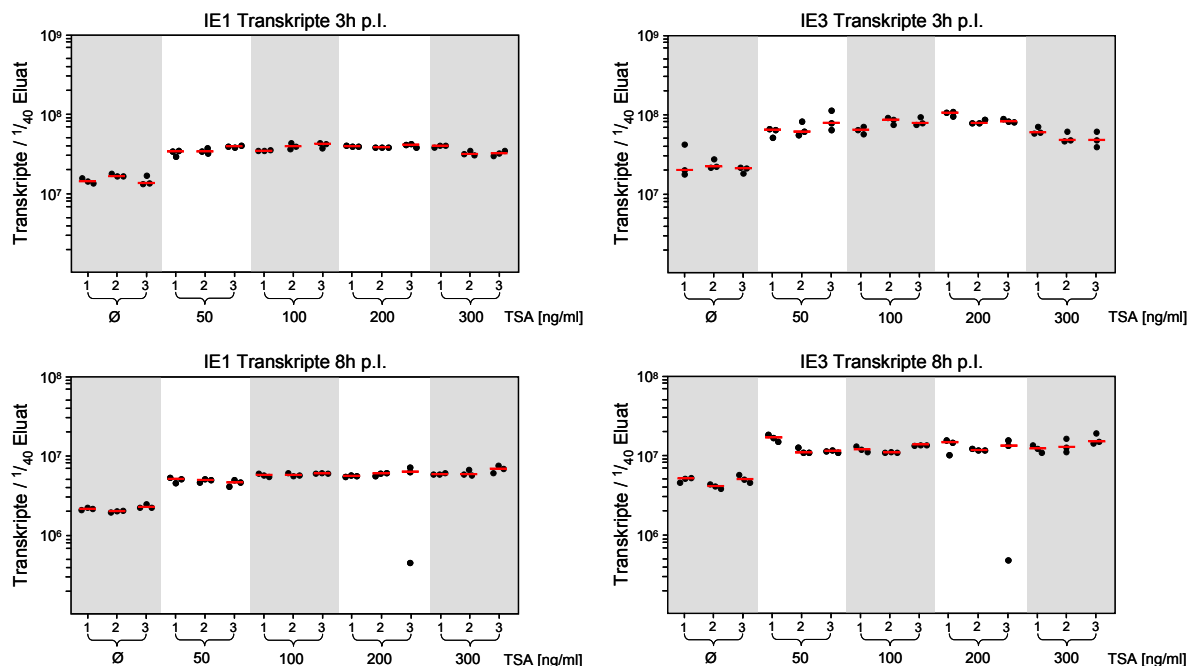
Die bisherigen Daten haben bewiesen, dass sich in latent infizierten LSEC mit geringer Frequenz virale Transkripte sowohl direkt nach LSEC Isolierung (IE1 Transkripte) als auch nach 24h Kultur (IE1 und IE3 Transkripte) nachweisen lassen. Im folgenden Versuch sollte geklärt werden, ob durch die Kultivierung der LSEC mit HDAC Inhibitoren eine Erhöhung der Expression viraler Transkripte erzielt werden kann (Übersicht: Bain et al., 2006; Übersicht: Tang & Maul, 2006). Dafür wurden folgende HDAC Inhibitoren verwendet: Trichostatin A (TSA) (Yoshida et al., 1990; Übersicht: Yoshida et al., 1995), Natriumbutyrat (SB) (Kruh, 1982) und Valproat (VPA) (Göttlicher et al., 2001). Von anderen Gruppen konnte gezeigt werden, dass TSA die Expression von IE1 und E1 Transkripten in mit mCMV infizierten MEF stark erhöhen kann (Tang & Maul, 2003) und das sowohl TSA als auch SB Reaktivierung von latentem HSV-1 aus neuronalen Zellen induzieren (Danaher et al., 2005). Der Einsatz des dritten in dieser Arbeit verwendeten HDAC Inhibitors VPA bewirkte eine Histonacetylierung, DNA Demethylierung und Expression ektopisch methylierter CMV-GFP Plasmide in HEK 293 Zellen (Detich et al., 2003).

TSA, SB und VPA wurden zuerst in unterschiedlichen Konzentrationen auf nicht infizierten MEF hinsichtlich ihrer Toxizität untersucht. Anschließend wurden infizierte MEF mit unterschiedlichen Konzentrationen TSA, SB und VPA behandelt, um Änderungen der viralen Genexpression zu verfolgen. Nach diesen Untersuchungen erfolgte die Inkubation der latent infizierten LSEC mit jeweils einem der drei HDAC Inhibitoren.

In der Literatur wurde TSA in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt, um Virusreaktivierungen bzw. virale Genexpressionen zu untersuchen: Danaher und Kollegen (2005) konnten zeigen, dass HSV-1 Reaktivungsereignisse dosisabhängig zwischen 4 und 400ng/ml TSA eintraten. Die virale Genexpression von mCMV wurde von Tang & Maul (2003) mit 50 bis 400ng/ml TSA untersucht, wobei gezeigt wurde, dass die *ie1* und *e1* Genexpression schon mit der kleinsten eingesetzten Menge von 50ng/ml erhöht wird. DeWire & Damania (2005) verwendeten für Reaktivierungsversuche mit latentem *Rhesus monkey rhadinovirus* (RRV) zwischen 100nM (entspricht ~30ng/ml) und 2µM (entspricht ~600ng/ml) TSA. SB wurde von Danaher und Kollegen (2005) von 0,5 bis 50mM eingesetzt. Es zeigte sich, dass die HSV-1 Reaktivungsereignisse mit SB vergleichbar mit denen der TSA Versuche waren. Die zelluläre Genexpression und die virale Expression des bovinen

Leukämievirus (BLV) konnten *in vitro* durch Gabe von 0,5 bis 10mM VPA gesteigert werden (Achachi et al., 2005).

Um geeignete Konzentrationen für TSA, VPA und SB zu ermitteln, wurden MEF für 24h mit definierten Mengen der einzelnen Substanzen inkubiert und danach im FACS der Anteil PI-positiver und Annexin V-positiver Zellen bestimmt (2.12.2.3). Dazu wurden VPA und SB mit einer Endkonzentration von 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 und 10mM und TSA mit einer Endkonzentration von 0,25, 0,5, 1, 2, 5, 10, 15, 50, 150 und 600ng/ml auf MEF gegeben. FACS Messungen ergaben, dass TSA auf MEF mit steigender Konzentration einen toxischen Effekt hat (40% Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> Zellen bei 600ng/ml TSA), welcher bei maximalen SB und VPA Konzentrationen weniger stark ausgeprägt war (maximal 15 bis 20% Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> Zellen bei 10mM SB oder VPA) (Daten nicht gezeigt). Um Änderungen der Transkriptionsrate von IE1 und IE3 nach TSA Behandlung zu untersuchen, wurden MEF mit unterschiedlichen Konzentrationen an TSA (50, 100, 200, 300ng/ml) inkubiert und nach zwei Stunden mit 0,05 PFU/Zelle mCMV zentrifugal infiziert (entspricht einer MOI von 1). Nach jeweils 3h und 8h Inkubation wurde aus den Ansätzen RNA isoliert und diese in eine IE1- und IE3-spezifische *Duplex* RT-qPCR eingesetzt. SB und VPA wurden ebenfalls auf MEF getestet. Dazu wurden die Zellen mit den unterschiedlichen Konzentrationen (0,5, 1, 5, 10mM SB und VPA) für 2h inkubiert und analog zum vorherigen Versuch mit 0,05 PFU/Zelle mCMV zentrifugal infiziert. Nach 2h und 4h Inkubation wurde Gesamt-RNA isoliert, welche ebenfalls in eine IE1- und IE3-spezifische *Duplex* RT-qPCR eingesetzt wurden. In den Quantifizierungen konnte lediglich eine Erhöhung der Transkriptionsrate um den Faktor 2 bis 4 nach Inkubation mit TSA beobachtet werden (Abb. 3.48), bei SB und VPA Inkubationen gab es keine Änderungen in der Menge viraler Transkripte (Daten nicht gezeigt).

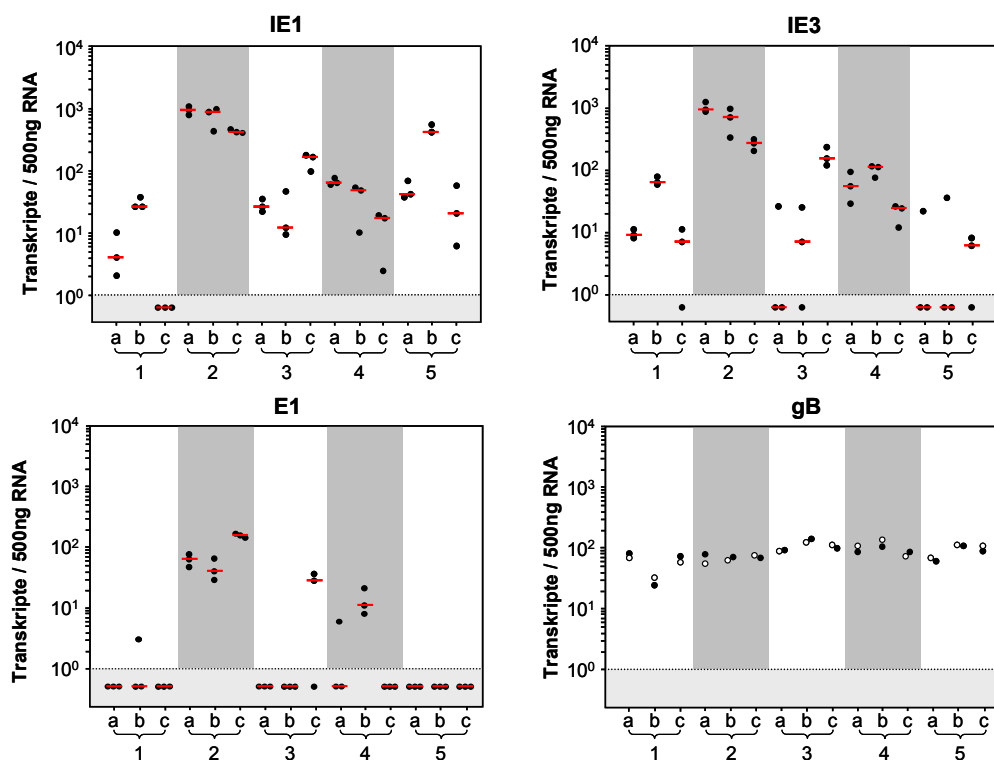


**Abb. 3.48 Erhöhung der *ie1* und *ie3* Genexpression in infizierten MEF nach TSA Inkubation**

Konfluente MEF wurden mit unterschiedlichen TSA Konzentrationen (50, 100, 200, 300ng/ml Endkonzentration) inkubiert und nach 2h mit 0,05 PFU/Zelle mCMV-wt zentrifugal infiziert. Alle getesteten Konzentrationen wurden als Triplikate angesetzt (1-3). Jeweils 3h (oben) und 8h (unten)

nach Infektion (p.i.) wurde aus allen Ansätzen Gesamt-RNA aufgereinigt und jeweils  $1/40$  des gesamten Ansatzes in eine IE1 (links) und IE3 (rechts) spezifische *Duplex* RT-qPCR eingesetzt. Alle Proben wurden als Triplikate quantifiziert (schwarz), die jeweiligen Mediane sind rot eingezeichnet.

Im folgenden Versuch wurden latent infizierte LSEC entweder mit 50ng/ml TSA, 10mM SB oder 10mM VPA inkubiert, um eine Erhöhung der latenten viralen Genexpression zu induzieren. Dazu wurden aus den Lebern von 5 latent infizierten Mäusen durch MACS Separation LSEC isoliert. Von den isolierten LSEC wurde aus einem Aliquot DNA aufgereinigt zur anschließenden Quantifizierung der viralen DNA *Load* und des Anteils *tdy*-positiver Zellen. Die Quantifizierungen ergaben für die virale DNA *Load* einen Median von  $1 \times 10^3$  Virusgenomen pro  $1 \times 10^6$  Zellen und einen Anteil *tdy*-positiver Zellen von 15% (Daten nicht gezeigt). Die restlichen Zellen wurden zur Transkriptanalyse in 15 Aliquots geteilt. Von den 15 Aliquots wurde aus drei Aliquots direkt nach LSEC Isolierung Gesamt-RNA aufgereinigt, die restlichen 12 Aliquots (jeweils  $4 \times 10^6$  Zellen) wurden getrennt für 24h in Kultur genommen. Davon wurden drei Aliquots unbehandelt, 3 Aliquots mit TSA, 3 Aliquots mit SB und 3 Aliquots mit VPA behandelt kultiviert. Aus den Kulturen wurde am nächsten Tag Gesamt-RNA isoliert und die RNA aller Aliquots in eine IE1-, IE3-, E1- und M55/gB-spezifische RT-qPCR eingesetzt. Die Ergebnisse der Transkriptanalysen sind in Abb. 3.49 dargestellt.



**Abb. 3.49** Transkriptanalysen aus LSEC nach Behandlung mit SB, VPA oder TSA

Die isolierten LSEC von 5 vereinigten Lebern latent infizierter Mäuse wurden in 15 Aliquots aufgeteilt, die wie folgt unterteilt wurden. Aus den ersten drei Aliquots wurde direkt nach LSEC Isolierung Gesamt-RNA aufgearbeitet (1a-c). Die restlichen 12 Aliquots wurden für 24h in Kultur genommen, davon 3 Aliquots unbehandelt (2a-c), 3 Aliquots mit 10mM SB behandelt (3a-c), 3 Aliquots mit 10mM VPA behandelt (4a-c) und drei Aliquots mit 50ng/ml TSA behandelt (5a-c). Nach 24h wurde aus den 12 Aliquots Gesamt-RNA isoliert und jeweils  $1/10$  der Gesamtmenge aller gereinigten RNAs in eine IE1-, IE3-, E1- und M55/gB-spezifische RT-qPCR eingesetzt. Alle Quantifizierungen sind jeweils auf

500ng RNA normiert dargestellt. Die Quantifizierungen für IE1, IE3 und E1 wurden als Triplikate (schwarz) angesetzt und die entsprechenden Mediane rot eingezeichnet. Hellgrau unterlegt sind alle Ansätze, in welchen nach 50 PCR Zyklen keine viralen Transkripte detektierbar waren. Da M55/gB keine Introns besitzt, konnte in der RT-qPCR keine Unterscheidung zwischen quantifizierter RNA oder DNA getroffen werden, deshalb wurde jeweils ein Ansatz mit und ein Ansatz ohne RT-Schritt durchgeführt. In der Abb. sind die quantifizierten Werte für M55/gB mit RT-Schritt als weiß gefüllter Ring, die quantifizierten Werte ohne RT-Schritt schwarz abgebildet.

Messungen der RNA Konzentrationen ergaben für die mit SB, VPA und TSA inkubierten Zellen eine Gesamt-RNA Ausbeute, welche bis zu 50% reduziert war gegenüber der RNA Ausbeute aus den unbehandelten Zellen nach Kultur (Daten nicht gezeigt). In Abb. 3.49 ist deutlich zu erkennen, dass in nahezu allen Ansätzen IE1 und IE3 Transkripte nachgewiesen werden konnten, wobei die Menge der IE1 und IE3 Transkripte in den kultivierten Ansätzen ohne zusätzliche Behandlung mit HDAC Inhibitoren am höchsten war (IE1:  $1 \times 10^3$  und IE3:  $3 \times 10^2$  bis  $1 \times 10^3$  Transkripte pro 500ng RNA). Hiermit konnte auch noch einmal das Ergebnis von 3.9.3 bestätigt werden, dass die Expression viraler IE1 und IE3 Transkripte durch eine Kultivierung der LSEC um 1 bis 2  $\log_{10}$  Stufen erhöht wird. In den Ansätzen, die mit VPA, SB oder TSA behandelt waren, war hingegen eine deutliche Abnahme sowohl von IE1 als auch von IE3 Transkripten gegenüber den unbehandelten Ansätzen zu erkennen. Ebenfalls konnten in allen 3 Ansätzen der unbehandelten Kulturen E1 Transkripte ( $1 \times 10^2$  Transkripte pro 500ng RNA) nachgewiesen werden. Ausgenommen einer Probe aus den mit SB behandelten Kulturen und einer Probe aus den mit VPA behandelten Kulturen waren alle anderen RNA Proben aus den kultivierten Zellen und den Zellen direkt nach Isolierung negativ für E1. Eine eindeutige Aussage über die Menge an M55/gB Transkripten ist nicht möglich, da in jedem Ansatz noch virale DNA nachgewiesen werden konnte. Da die Menge der quantifizierten Teilchen sowohl mit RT-Schritt als auch ohne RT-Schritt zu gleichen Ergebnissen führte, ist anzunehmen, dass ausschließlich vorhandene DNA quantifiziert wurde.

#### Zusammenfassung:

Durch erfolgreich etablierte RT-qPCRs können virale IE1, IE3, E1 und M55/gB Transkripte quantifiziert werden. In RNA aus gesamter Leber sind keine viralen Transkripte nachweisbar, dagegen konnten erstmals IE1 und IE3 Transkripte in LSEC detektiert werden. Eine zusätzliche Kultivierung der LSEC induziert eine Erhöhung der Transkriptionsrate, wobei neben IE1 und IE3 Transkripten auch E1 Transkripte nachgewiesen werden können. Der Einsatz der HDAC Inhibitoren VPA, SB und TSA erhöht die Expression viraler Transkripte während der Latenz in LSEC nicht.

### **3.10 mCMV Reaktivierung aus latent infizierten LSEC**

Wie schon unter 3.3 für die Explantkulturen der Leber, Lunge und Milz beschrieben, kann aus latent infizierten Organen ohne vorherige Immunsuppression eine Virusreaktivierung induziert werden. Zum endgültigen Beweis, dass die LSEC der latent infizierte Zelltyp in der Leber sind, sollte aus den isolierten latent infizierten LSEC eine Virus Reaktivierung induziert werden.

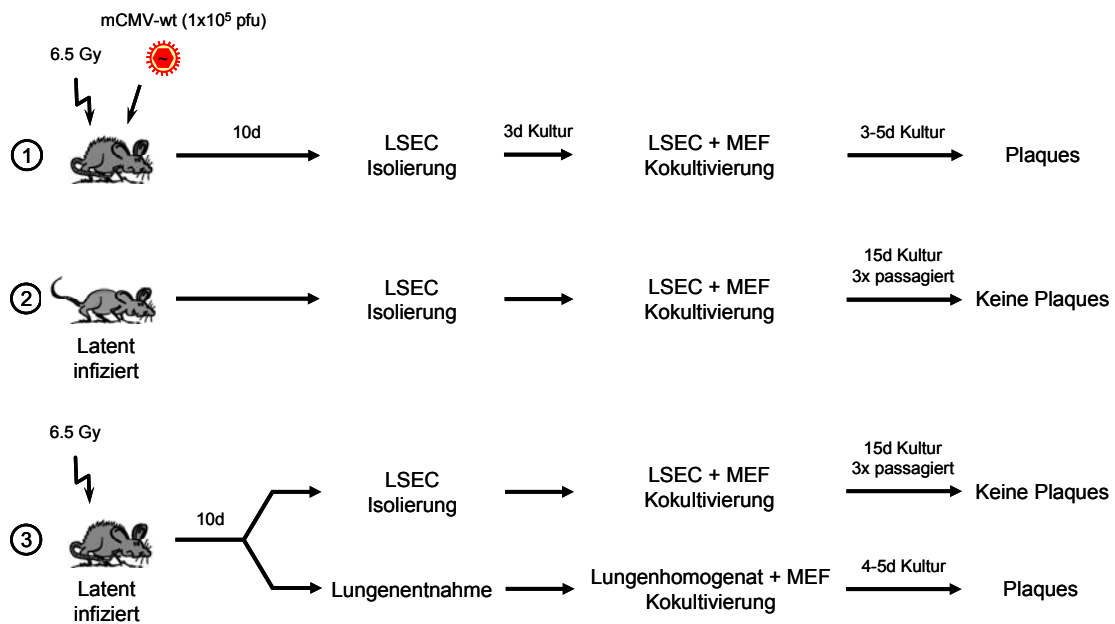
### 3.10.1 mCMV Reaktivierung durch Kokultivierung latent infizierter LSEC mit MEF

In früheren Arbeiten wurden Kokultivierungen zur Induktion und zum Nachweis der mCMV Reaktivierung entweder aus aufgereinigten latent infizierten B- oder T-Lymphozyten (Olding et al., 1975) oder aus Milzzellen (Mayo et al., 1978) zusammen mit MEF durchgeführt. In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob durch die Kokultivierung isolierter latent infizierter LSEC mit MEF eine mCMV Reaktivierung induziert werden kann.

Im ersten Experiment wurde als Vorversuch die Kokultivierung akut infizierter LSEC mit MEF getestet (Abb. 3.50 ①). Dazu wurden Mäuse durch Bestrahlung mit 6,5 Gy immunsupprimiert und mit mCMV-wt infiziert. Nach 10 Tagen wurden mittels MACS Separation LSEC isoliert und diese in Kultur genommen. Nach 3 Tagen Kultur wurden die LSEC abgelöst und mit MEF kokultiviert. In allen getesteten Kulturen konnten nach 3 bis 5 Tagen Plaques nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Nachdem bewiesen wurde, dass durch die Kokultivierung von LSEC aus akut infizierten und immunsupprimierten Mäusen mit MEF Plaques entstehen, wurden im zweiten Experiment aus drei latent infizierten Mäusen separat LSEC isoliert, die virale DNA *Load* bestimmt (1 bis  $2 \times 10^2$  Virusgenome pro  $1 \times 10^6$  Zellen, Daten nicht gezeigt) und die Zellen direkt mit MEF kokultiviert (Abb. 3.50 ②). Die Kokulturen wurden mit Erreichen der Konfluenz nach 4 bis 5 Tagen jeweils weiter passagiert. Insgesamt wurden die Zellen 15 Tage kultiviert und dabei 3x passagiert. Während der Kultivierung konnten zu keinem Zeitpunkt Plaques detektiert werden.

Im dritten Experiment wurde der vorherige Versuch noch einmal wiederholt mit dem Unterschied, dass die latent infizierten Tiere durch Bestrahlung mit 6,5 Gy immunsupprimiert wurden (Abb. 3.50 ③). Diese Immunsuppression kann in latent infizierten Tieren eine mCMV Reaktivierung auslösen (Reddehase et al., 1994; Kurz et al., 1997). 10 Tage nach Bestrahlung wurden die Leber und zur Kontrolle auch die Lunge der einzelnen Tiere entnommen. Aus den Lebern wurden LSEC isoliert und mit MEF kokultiviert. Auch in diesem Versuch waren nach 3 Passagen, bzw. 15 Tagen Kultur der Zellen keine Plaques sichtbar. Als Positivkontrolle wurden aus den isolierten Lungen Organhomogenate angefertigt, welche titriert auf MEF gegeben wurden. In diesen Ansätzen konnten, wie zu erwarten, nach 4 bis 5 Tagen Kultur Plaques detektiert werden, da die Lunge ein Hauptort der mCMV Latenz und Reaktivierung ist (Balthesen et al., 1993).



**Abb. 3.50 Reaktivierung durch Kokultivierung von LSEC oder Lungengewebe auf MEF**

① Reaktivierung durch Kokultivierung von MEF und LSEC aus akut infizierten Mäusen. 10 Tage nach Infektion und Immunsuppression wurden LSEC isoliert und nach 3 Tagen Kultur mit MEF kokultiviert. ② Reaktivierung durch Kokultivierung von LSEC aus latent infizierten Mäusen. Nach Isolierung wurden LSEC mit MEF kokultiviert und für 15 Tage in Kultur gehalten. Während der Kultivierung wurden die Zellen 3x passagiert. ③ Reaktivierung durch Kokultivierung aus latent infizierten Mäusen nach Immunsuppression. Aus latent infizierten Mäusen wurden 10 Tage nach Bestrahlung LSEC isoliert und die Lunge entnommen. Die LSEC wurden mit MEF analog zu ② kokultiviert. Die Lungen wurden homogenisiert und das titrierte Homogenat ebenfalls mit MEF kokultiviert.

Ein großes Problem isolierter LSEC stellt die Lebensfähigkeit der Zellen in Kultur dar, welche schon nach 48h Kultivierung abnimmt. Mittlerweile existieren verschiedene Ansätze, um die Lebensdauer der LSEC in Kultur zu verlängern. So wurden beispielsweise serumfreie Medien (Krause et al., 2000; Elvevold et al., 2005) zur Verbesserung der Kulturbedingungen eingesetzt, die allerdings ungeeignet für die Kultivierung der MEF sind, da MEF unter Kulturbedingungen serumhaltiges Medium benötigen.

### 3.10.2 mCMV Reaktivierung durch adoptiven Transfer latent infizierter LSEC

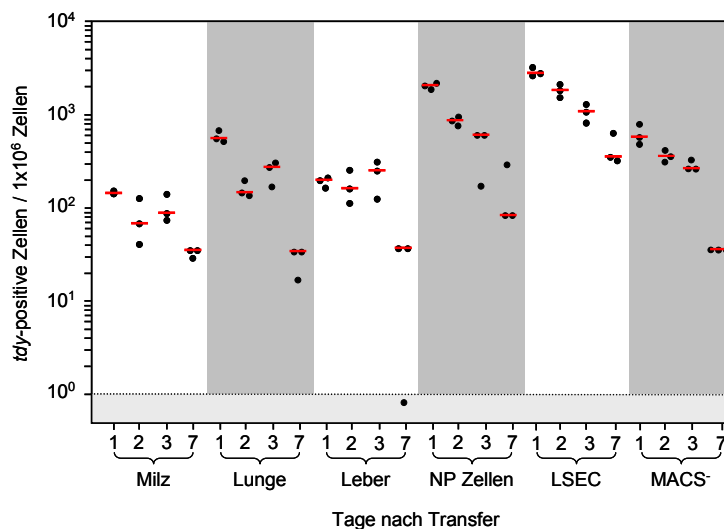
*In vivo* sind LSEC nicht in direktem Kontakt zu Hepatozyten, da sie durch den Dissé'schen Raum voneinander getrennt werden. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass Hepatozyten die LSEC durch die Sekretion von Mitogenen wie beispielsweise VEGF lebensfähig halten. Dies konnte durch die Stimulation kultivierter LSEC in Hepatozyten-konditioniertem Medium bewiesen werden (Krause et al., 2000). Um in den folgenden Experimenten optimale Kulturbedingungen für die isolierten LSEC zu erreichen, wurde ein Transfermodell getestet, in welchem isolierte latent infizierte LSEC aus einem Tier in ein nicht infiziertes Tier adoptiv transferiert wurden. Der adoptive Transfer isolierter Endothelzellen wurden bereits beschrieben (Limmer et al, 2000; Benten et al., 2005). So konnte gezeigt werden, dass sich transferierte LSEC beispielsweise in der Lunge, der Milz, den Nieren und der Leber des

Empfängers nachweisen lassen (Benten et al., 2005). Nach dem Zelltransfer der latent infizierten LSEC wurden aus den transplantierten Tieren analog zu 3.3 die Organe entnommen und diese kultiviert. Von den Kulturüberständen wurden in regelmäßigen Abständen Überstände entnommen und auf MEF zum Nachweis einer produktiven Infektion überführt (2.8.3).

### 3.10.2.1 Adoptiver Transfer isolierter LSEC aus männlichen Mäusen in weibliche Mäuse

In Vorversuchen wurde zunächst getestet, ob sich isolierte LSEC nach adoptivem Transfer in Empfängermäusen ansiedeln und in welchen Organen sie nachzuweisen sind. Dazu wurden LSEC aus ♂ nicht-infizierten Mäusen isoliert und in ♀ Mäuse übertragen. Anschließend wurden den ♀ Empfängertieren die Organe Milz, Lunge und Leber entnommen, DNA isoliert und mit einer *tdy*- und *pthrp*-spezifischen qPCR der Anteil y-chromosomaler Zellen quantifiziert.

Aus drei Lebern ♂ Mäuse wurden LSEC isoliert, in PBS aufgenommen und in vier ♀ Mäusen *i.v.* injiziert. Pro Empfängertier wurden  $1,2 \times 10^7$  Zellen übertragen, wobei in Maus #4 mit  $8 \times 10^6$  Zellen etwas weniger Zellen transferiert wurden. An den Tagen 1, 2, 3 und 7 nach LSEC Transfer wurden von jeweils einer Maus Lunge, Milz und Leber entnommen. Aus der Leber wurden nichtparenchymale Zellen und LSEC aufgereinigt und aus allen Ansätzen (Milz, Lunge, Leber, nichtparenchymale Zellen, LSEC, MACS Durchfluss) DNA isoliert. Diese wurde in eine *tdy*- und *pthrp*-spezifische qPCR eingesetzt und aus den quantifizierten Mengen der Anteil *tdy*-positiver Zellen pro  $1 \times 10^6$  Zellen bestimmt (Abb. 3.51).



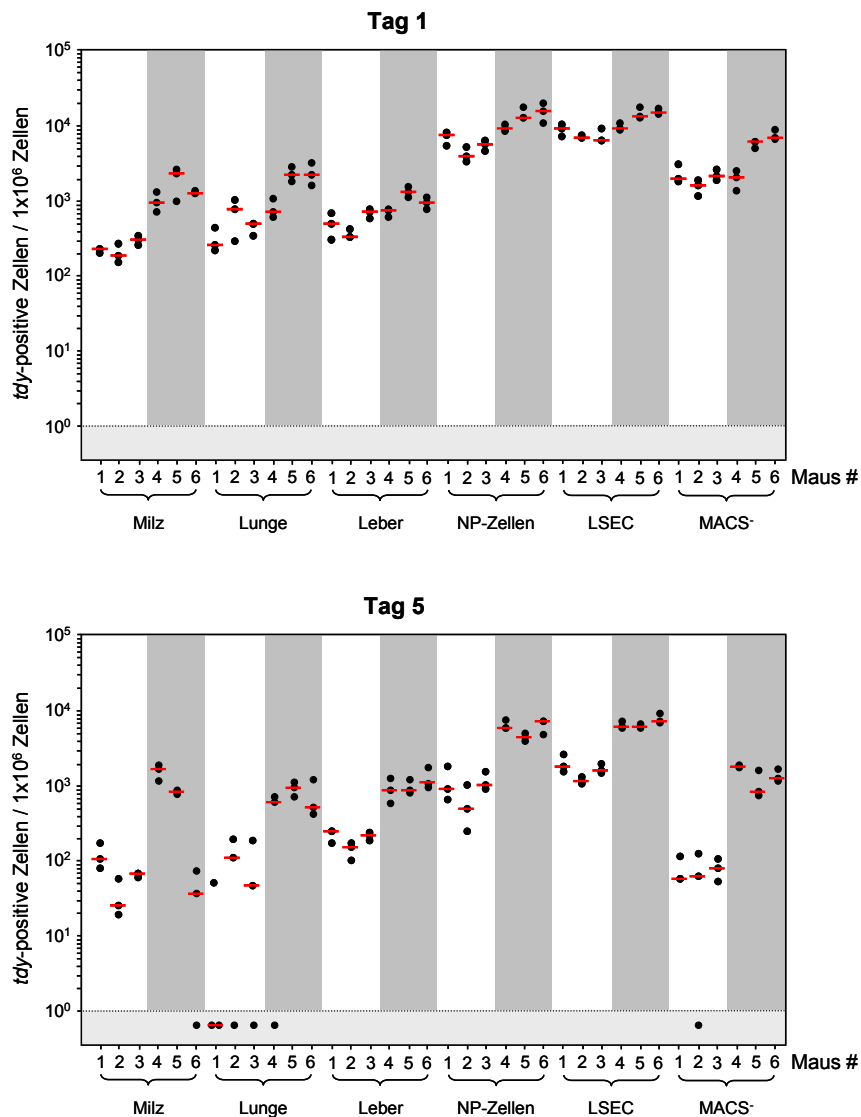
**Abb. 3.51 Kinetik des Anteils *tdy*-positiver LSEC nach adoptivem Transfer**

An den Tagen 1, 2, 3 und 7 nach LSEC (♂ Genotyp) Transfer wurde aus jeweils einem Empfängertier (♀ Genotyp) Milz, Lunge und Leber entnommen. Aus der Leber wurden nichtparenchymale Zellen, LSEC und der Durchfluss der MACS Separation (MACS') isoliert, aus allen Ansätzen DNA aufgereinigt und diese in eine *tdy*- und *pthrp*-spezifische qPCR mit dem Plasmid-Standard pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy eingesetzt. Die Menge *tdy*-positiver Zellen wurde auf  $1 \times 10^6$  Zellen normiert. Alle Ansätze wurden als Triplikate quantifiziert (schwarz) und der Median rot eingezeichnet. Hellgrau dargestellt sind alle Ansätze, in welchen nach 50 PCR Zyklen keine y-chromosomale DNA detektiert werden konnte.

Wie in der Abb. 3.51 zu erkennen, konnten in allen Organen Zellen mit ♂ Genotyp, demzufolge LSEC, nachgewiesen werden. In allen getesteten Organen wurden an Tag 7 die wenigsten Zellen nachgewiesen, was nicht nur mit der Zeit zwischen Zelltransfer und Organentnahme, sondern in erster Linie mit der Menge transferierter Zellen zusammenhängt, da in Maus #4, wie oben beschrieben, weniger Zellen als in den restlichen drei Mäusen transferiert wurden. Da allerdings nicht nur die Abnahme der transferierten Zellen, sondern allgemein deren Lebensfähigkeit nach Transfer im Empfänger untersucht werden sollte, wurde somit gezeigt, dass 7 Tage nach Transfer immer noch lebende LSEC nachweisbar sind. Einen Tag nach Transfer konnte in der Lunge die höchste Zahl *tdy*-positiver Zellen nachgewiesen werden. Damit konnte Benten und Kollegen (2005) bestätigt werden, in deren Arbeit 1h nach LSEC Transfer die größte Zahl transferierter Zellen in der Lunge detektiert wurde. Der höchste Anteil ♂ LSEC wurde in der MACS-separierten LSEC Fraktion nachgewiesen. Da mit MACS *Micro-Beads* keine spezifische Isolierung toter Zellen möglich ist, müssen die aus der Leber isolierten ♂ LSEC lebensfähig sein.

Es stellte sich die Frage, ob eine durch Bestrahlung induzierte Immunsuppression der ♀ Empfänger eine bessere Ansiedelung der transferierten LSEC ermöglicht. Zur Klärung dieser Frage wurden sechs ♀ Mäuse mit 6,5 Gy bestrahlt und bekamen am nächsten Tag  $1 \times 10^7$  LSEC aus ♂ Spendern transferiert. Zusätzlich wurden zur Kontrolle sechs nicht bestrahlten ♀ Empfängern jeweils  $1 \times 10^7$  LSEC transferiert. Von jeweils 3 bestrahlten und nicht bestrahlten Tieren wurden an Tag 1 und Tag 5 nach LSEC Transfer Leber, Lunge und Milz entnommen. Wie schon zuvor beschrieben, wurden aus den Lebern der einzelnen Tiere nichtparenchymale Zellen, LSEC und MACS<sup>-</sup> Zellen aufgereinigt. Aus den isolierten DNAs der gesamten Ansätze wurde der Anteil *tdy*-positiver Zellen und die Gesamtzellzahl bestimmt. Die Ergebnisse der Quantifizierungen sind in Abb. 3.52 dargestellt.





**Abb. 3.52 Kinetik des Anteils *tdy*-positiver LSEC in bestrahlten oder unbestrahlten Mäusen nach adoptivem LSEC Transfer**

Jeweils 3 nicht bestrahlten (Maus #1-3, weiß unterlegt) und 3 bestrahlten (Maus #4-6, grau unterlegt) Mäusen wurden an Tag 1 (oben) und Tag 5 (unten) nach LSEC Transfer Milz, Lunge und Leber entnommen. Aus den Lebern wurden nichtparenchymale Zellen, LSEC und MACS<sup>-</sup> Zellen aufgereinigt, aus allen Organen und Zellen DNA isoliert und in eine *tdy*- und *pthrp*-spezifische qPCR mit dem Plasmid-Standard pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy eingesetzt. Alle Proben wurden als Triplikate quantifiziert (schwarz) und sind auf  $1 \times 10^6$  Zellen normiert. Die jeweiligen Mediane sind rot eingezeichnet. Hellgrau unterlegt sind alle Ansätze, in welchen nach 50 PCR Zyklen keine y-chromosomale DNA detektierbar war.

Mit diesem Versuch konnte deutlich gezeigt werden, dass eine vorherige Bestrahlung der Empfänger einen positiven Effekt auf die Ansiedelung der LSEC ausübt. An Tag 1 nach Transfer war schon eine leichte Erhöhung des Anteils *tdy*-positiver Zellen in der bestrahlten Gruppe zu erkennen. Dieser Effekt wurde an Tag 5 noch deutlicher, hier war eine Erhöhung des Anteils ♂ LSEC um den Faktor 5 bis 10 zwischen bestrahlten und unbestrahlten Tieren zu beobachten.

Alle Zellen, die schnell proliferieren, sind strahlungssensitiv, wie z.B. die Lymphozyten in der Milz. Damit können die zwei hohen Werte in der Milz für Maus #4 und #5 5 Tage nach LSEC Transfer erklärt werden, welche dadurch bedingt sind, dass die Zellzahl in der Milz stark

abahm und deshalb die Anzahl der ♂ LSEC relativ dazu erhöht ist. Dieser Effekt war allerdings nur in der Milz zu beobachten. In der Lunge, der Leber, den nichtparenchymalen Zellen, den LSEC und dem MACS Durchfluss konnten keine Unterschiede in der Menge der quantifizierten Zellzahlen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

### 3.10.2.2 Adoptiver Transfer latent infizierter LSEC

Aufgrund der gewonnenen Ergebnisse der Vorversuche (3.10.2.1) konnte der adoptive Transfer mit isolierten LSEC aus latent infizierten Mäusen angeschlossen werden. In diesem Transfer wurde versucht, möglichst viele latent infizierte LSEC zu übertragen, um die Wahrscheinlichkeit einer mCMV Reaktivierung im Empfänger zu erhöhen. Dazu wurden aus 3 Lebern latent infizierter Mäuse LSEC isoliert, ein Aliquot zur Bestimmung der viralen DNA *Load* entnommen und die restlichen Zellen auf  $2 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Diese wurden einer Maus, die am Tag zuvor mit 6,5 Gy bestrahlt wurde, in 2 Etappen á 500µl *i.v.* injiziert. Nach 24h wurden Milz, Lunge und Leber entnommen und jedes Organ in kleine Stücke von maximal 4-5mm Kantenlänge geschnitten. Die Stücke wurden einzeln in Kultur genommen und ergaben in 24-well Platten folgende Verteilung: für die Milz wurde eine Platte (24 Stücke), für die Lunge wurden 2 Platten (48 Stücke) und für die Leber 7 Platten (168 Stücke) verwendet. Standardmäßig wurde alle 4 Tage die Hälfte des Mediums abgezogen und durch neues Medium ersetzt. Die Überführung der Überstände auf MEF zum Plaquetest erfolgte 1 Woche, 3, 5, 6, 7, 8, 9, und 13 Wochen nach Kultivierung. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Tab. 3.3 dargestellt.

Transferierte LSEC

	W1	W3	W5	W6	W7	W8	W9	W13
Milz	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24
Lunge	0/48	0/48	2/48	2/48	2/48	2/48	2/48	2/48
Leber	0/168	0/168	0/168	0/168	0/168	0/168	0/168	0/168

**Tab. 3.3 mCMV Reaktivierung nach adoptivem Transfer latent infizierter LSEC**

Die entnommenen Organe Milz, Lunge und Leber wurde gestückelt (Milz: 24 Stücke, Lunge: 48 Stücke, Leber: 168 Stücke) und die einzelnen Stücke separat in Kultur genommen. Nach 1 Woche (W), 3, 5, 6, 7, 8, 9 und 13 Wochen wurden Kulturüberstände entnommen und auf MEF zum Plaquetest übertragen. Dargestellt sind der Anzahl der Reaktivierungen (rot) pro Gesamtzahl der Stücke für das jeweilige Organ zu jedem Zeitpunkt.

Wie in Tab. 3.3 gezeigt, konnten in 2 von 240 Stücken nach 5 Wochen Kultur mCMV Reaktivierungen nachgewiesen werden, welche bis zur Beendigung des Versuches nach 13 Wochen Kultivierung auf MEF Plaques ausbildeten. Beide Reaktivierungsereignisse wurden in Kulturen von Gewebestücken aus der Lunge nachgewiesen. Dies lässt sich dadurch

erklären, dass an Tag 1 nach Transfer die größte Menge transplantierte LSEC in der Lunge nachzuweisen war (Abb. 3.51). Zu Beginn des Versuches wurde, wie oben beschrieben, die virale DNA *Load* quantifiziert, welche bei  $1 \times 10^3$  Virusgenomen pro  $1 \times 10^6$  Zellen mit einem Anteil *tdy*-positiver Zellen von 11% lag (Daten nicht gezeigt).

Mit den aus 3.8 erhaltenen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass sich in einer latent infizierten Zelle durchschnittlich 11 Virusgenome befinden. Damit kann die Anzahl der transferierten Zellen berechnet werden, die latente mCMV Genome tragen. Bei  $1 \times 10^3$  Virusgenomen pro  $1 \times 10^6$  LSEC lagen  $9,1 \times 10^1$  latent infizierte Zellen vor. Im adoptiven Transfer wurden  $2 \times 10^7$  LSEC übertragen, in welchen sich demzufolge  $1,8 \times 10^3$  latent infizierte Zellen mit insgesamt  $2 \times 10^4$  Virusgenomen befanden. Da es weiterhin nicht möglich ist, quantitativ alle transferierten latent infizierten LSEC in den aus dem LSEC Empfänger entnommenen Organen nachzuweisen, ist davon auszugehen, dass die Frequenz der Reaktivierung durch LSEC Transfer ein noch selteneres Ereignis als die Frequenz der Reaktivierung aus Leber eines latent infizierten Tieres (3.3.2) darstellt.

Zur Verifizierung, dass die detektierten Reaktivierungen im vorherigen Versuch nicht eventuell durch eine Kontamination der LSEC durch andere latent infizierte Zellen, die durch die MACS Aufreinigung zusammen mit den LSEC isoliert wurden, zustande kamen, wurde der adoptive Transfer noch einmal wiederholt. Diesmal allerdings mit dem Unterschied, dass nicht nur die isolierten LSEC in eine Maus, sondern auch die Zellen der MACS<sup>-</sup> Fraktion, also die gesamte restliche nichtparenchymale Zellfraktion ohne die LSEC, in eine zweite Maus transferiert wurden.

Analog zum ersten LSEC Transfer Versuch wurden nichtparenchymale Zellen aus 3 latent infizierten Mäusen aufgereinigt und diese mittels MACS Aufreinigung in LSEC und MACS<sup>-</sup> Fraktion getrennt. Von jeder Fraktion wurde ein Aliquot zur Bestimmung der viralen DNA *Load* entnommen und anschließend  $1,5 \times 10^7$  LSEC, bzw.  $1,5 \times 10^7$  Zellen der MACS<sup>-</sup> Fraktion separat in jeweils eine Maus in die Schwanzvene injiziert. Beide Mäuse wurden am Tag zuvor mit 6,5 Gy bestrahlt. Nach 24h wurden aus beiden Mäusen jeweils Milz, Lunge und Leber entnommen, gestückelt und jedes Stückchen separat in Kultur genommen. Für die Stückelung der Organe ergaben sich folgende Kulturansätze: LSEC Fraktion: Milz: 18 Stücke, Lunge: 40 Stücke, Leber: 158 Stücke und MACS<sup>-</sup> Fraktion: Milz: 10 Stücke, Lunge: 50 Stücke, Leber: 118 Stücke. Standardmäßig wurde alle 4 Tage die Hälfte des Mediums abgenommen und durch neues Medium ersetzt. Die Überführung der Überstände auf MEF zum Plaquestest erfolgte 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10 und 11 Wochen nach Kultivierung. Das Ergebnis des Versuches ist in Tab. 3.4 dargestellt.

Transferierte LSEC

	W3	W5	W6	W7	W8	W9	W10	W11
Milz	0/18	0/18	0/18	0/18	0/18	0/18	0/18	0/18
Lunge	0/40	1/40	1/40	1/40	1/40	0/40	0/40	0/40
Leber	0/158	0/158	0/158	0/158	0/158	0/158	0/158	0/158

Transferierte MACS<sup>-</sup> Zellen

	W3	W5	W6	W7	W8	W9	W10	W11
Milz	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Lunge	0/50	0/50	0/50	0/50	0/50	0/50	0/50	0/50
Leber	0/118	0/118	0/118	0/118	0/118	0/118	0/118	0/118

**Tab. 3.4 mCMV Reaktivierung nach adoptivem Transfer latent infizierter LSEC und MACS<sup>-</sup> Fraktion**

Die Organe Milz, Lunge und Leber wurden 24h nach LSEC Transfer bzw. nach Transfer der MACS<sup>-</sup> Fraktion aus jeder Maus entnommen, gestückelt (LSEC Transfer: Milz: 18 Stücke, Lunge: 40 Stücke, Leber: 158 Stücke und MACS<sup>-</sup> Fraktion: Milz: 10 Stücke, Lunge: 50 Stücke, Leber: 118 Stücke) und separat in Kultur genommen. Nach 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10 und 11 Wochen (W) wurden Kulturüberstände entnommen und auf MEF zum Plaquetest übertragen. Dargestellt ist die Anzahl der Reaktivierungen (rot) pro Gesamtzahl der Stücke für das jeweilige Organ zu jedem getesteten Zeitpunkt.

Wie in Tab. 3.4 zu sehen, wurde in einem Lungenstück aus den Ansätzen der transferierten LSEC nach 5 Wochen Kultur eine Reaktivierung detektiert, wohingegen alle Ansätze der MACS<sup>-</sup> Fraktion über den gesamten Zeitraum von 11 Wochen negativ blieben. In der positiven Kultur des Lungenstückchens konnte bis zur Woche 8, also über einen Zeitraum von 4 Wochen, infektiöses Virus nachgewiesen werden. Analog zum ersten Versuch wurde die Reaktivierung in einem Stück der Lunge detektiert. Eine Quantifizierung der latenten viralen DNA der LSEC und der MACS<sup>-</sup> Fraktion vor Transfer ergab eine Menge von  $1,1 \times 10^3$  Virusgenome pro  $1 \times 10^6$  Zellen mit einem Anteil *tdy*-positiver Zellen von 22% für die LSEC Fraktion und eine Menge von  $2,2 \times 10^2$  Virusgenome pro  $1 \times 10^6$  Zellen mit einem Anteil von 87% *tdy*-positiver Zellen für die MACS<sup>-</sup> Fraktion (Daten nicht gezeigt). Hier wurde deutlich, dass in der MACS<sup>-</sup> Fraktion noch virale DNA nachgewiesen werden kann, die entweder aus nicht-eluierten LSEC oder aus einem anderen latent infizierten Zelltyp stammt. Allerdings konnte aus diesen Zellen keine Reaktivierung induziert werden.

Mit diesem Versuch konnte nicht nur das Ergebnis des ersten Versuchs bestätigt werden, es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Reaktivierung von latentem mCMV nicht

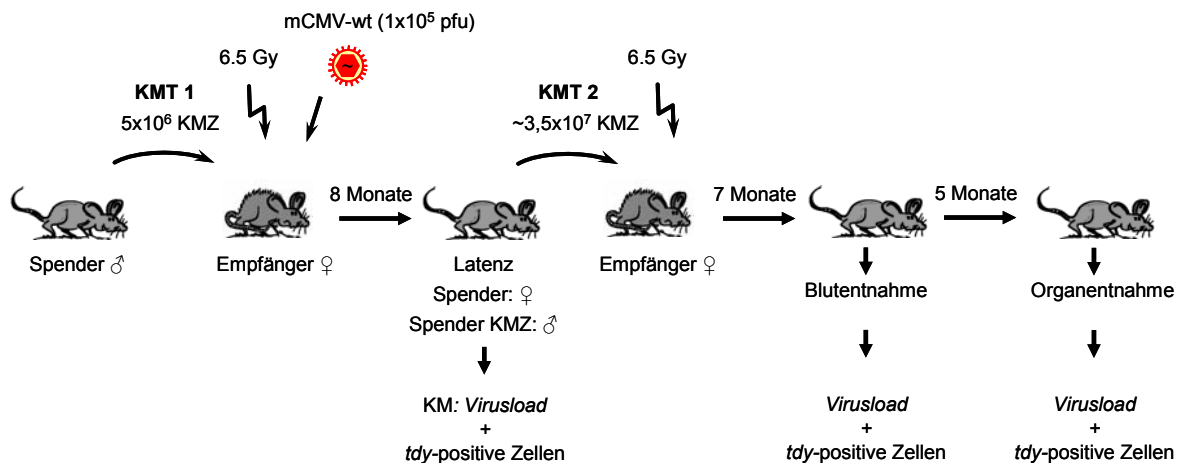
durch eine Kontamination der LSEC mit anderen latent infizierten Zellen zustande kam, da in der MACS<sup>-</sup> Fraktion in keinem der 178 getesteten Ansätze Reaktivierung nachgewiesen werden konnte.

#### Zusammenfassung:

Eine Kokultivierung isolierter latent infizierter LSEC mit MEF induziert keine Reaktivierung. Die LSEC können adoptiv aus latent infizierten Spendern transferiert werden und sind im Empfänger in Leber, Lunge und Milz nachweisbar. In den kultivierten Gewebestücken der entnommenen Organe aus den Empfängertieren können die viralen mCMV Genome der latent infizierten LSEC stochastisch reaktivieren, wohingegen in Organkulturen der transferierten MACS<sup>-</sup> Fraktion keine Reaktivierungsereignisse detektiert werden konnten. Dadurch konnte endgültig bewiesen werden, dass die LSEC der Latenzort für mCMV in der Leber latent infizierter Mäuse sind.

### **3.11 Ausschluss hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen des KM als Quelle latenter viraler Genome**

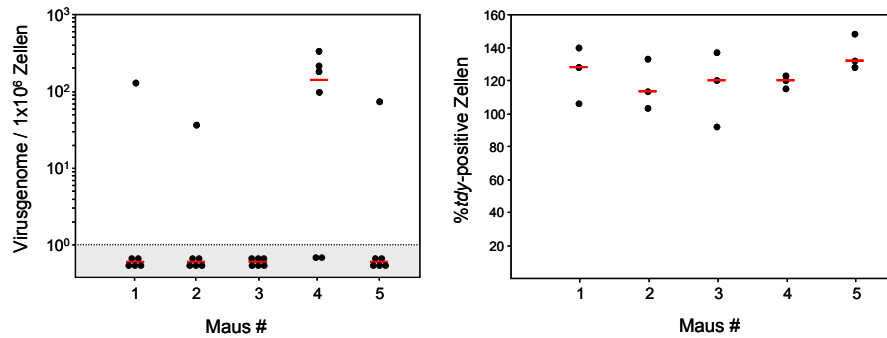
In früheren Arbeiten wurden Zellen hämatopoetischen Ursprungs wie beispielsweise Makrophagen und dendritische Zellen oder deren Vorläufer als zelluläre Orte von latentem mCMV beschrieben (Brautigam et al., 1979; Mitchell et al., 1996; Pollock et al., 1997). Ebenfalls wurde latentes hCMV in gemeinsamen Vorläufern von dendritischen und myeloiden Zellen detektiert, was zu der Hypothese führte, dass KMZ ein Reservoir für latentes hCMV darstellen (Kondo et al., 1994; Hahn et al., 1998; Slobedman & Mocarski, 1999). Da in allen vorangegangenen Versuchen ausschließlich LSEC, die nicht-hämatopoetischen Ursprungs sind, als Träger latenter viraler DNA in der Leber identifiziert wurden, sollten sich keine viralen Genome in KMZ, welche als Quelle für latent infizierte Zellen hämatopoetischen Ursprungs dienen, nachweisen lassen. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden aus 5 latent infizierten Tieren separat KMZ isoliert, welche in 5, zuvor durch Bestrahlung immunsupprimierte Empfänger transferiert wurden. Falls sich innerhalb der KMZ aus latent infizierten Spendern latent infizierte Zellen befinden, werden diese im zuvor bestrahlten KMT-Empfänger nach Ansiedelung klonal expandieren. Durch die klonale Expansion sollte virale DNA in differenzierten Zellen hämatopoetischen Ursprungs diverser Organe wie beispielsweise Lunge oder Leber nachweisbar sein (Abb. 3.53).



### Abb. 3.53 Protokoll der KMT latent infizierter Spender in weibliche Empfänger

Weibliche BALB/cJ Mäuse erhielten zur hämatoablativen Konditionierung eine Ganzkörperbestrahlung mit einer Dosis von 6,5 Gy. Nach Bestrahlung wurden  $5 \times 10^6$  KMZ aus männlichen (♂) Spendern in die weiblichen (♀) Empfänger transferiert und die Tiere mit einer Dosis von  $1 \times 10^5$  PFU mCMV-wt infiziert (KMT 1). 8 Monate nach KMT wurde aus den mittlerweile latent infizierten weiblichen BALB/cJ Mäusen KM entnommen und in weibliche Empfänger transferiert (KMT 2). Vor Transfer der KMZ wurden die Empfängertiere durch eine Ganzkörperbestrahlung mit 6,5 Gy immunsupprimiert. Die aus einem Spendertier entnommenen KMZ ( $\sim 3,5 \times 10^7$ ) wurden jeweils komplett in ein Empfängertier transferiert. Von jedem Spendertier wurde vor der KMT ein Aliquot KMZ entnommen, das zur Quantifizierung der viralen DNA Load und der Anteils tdy-positiver Zellen verwendet wurde. Nach 7 Monaten wurde den transplantierten Empfängern aus der Schwanzvene Blut entnommen und die virale DNA Load und der Anteil tdy-positiver Zellen quantifiziert. Die Organentnahme zur Quantifizierung der viralen DNA und des Anteils tdy-positiver Zellen erfolgte nach weiteren 5 Monaten.

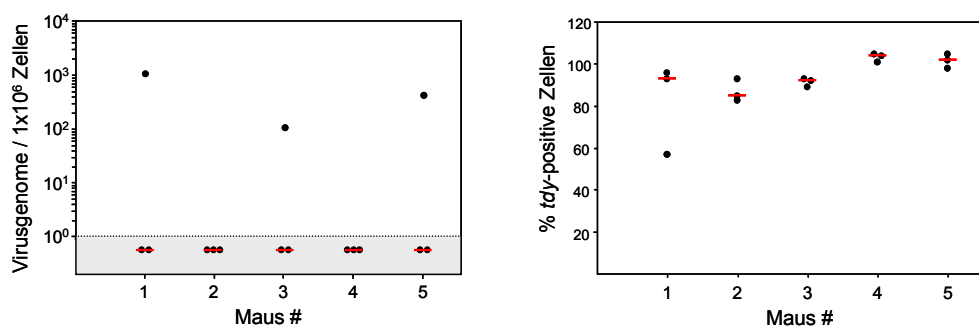
Aus 5 ♀ latent infizierten Mäusen wurden 8 Monate nach KMT mit ♂ Spendern (KMT 1) Knochenmarkzellen entnommen (Abb. 3.53) und in ♀ Empfänger, die zuvor mit 6,5 Gy bestrahlt wurden, transferiert (KMT 2). Alle isolierten KMZ wurden getrennt aufgearbeitet und separat in jeweils eine Maus injiziert. Im Mittel wurden  $3,5 \times 10^7$  KMZ pro Maus übertragen ( $3,2 \times 10^7$  bis  $4,4 \times 10^7$  Zellen). Von allen Ansätzen wurde jeweils ein Aliquot KMZ entnommen, daraus DNA aufgereinigt und in eine M55/gB-, pthrp- und tdy-spezifische qPCR zur Quantifizierung der viralen DNA Load und des Anteils tdy-positiver Zellen eingesetzt. Die Ergebnisse der Quantifizierungen sind in Abb. 3.54 dargestellt. Wie zu erkennen, waren aus dem KM von 5 latent infizierten Tieren nur in einem Tier (Maus #4) virale Genome mit einem Median von  $1 \times 10^2$  Virusgenomen pro  $1 \times 10^6$  Zellen nachweisbar. Wie oben beschrieben, wurden die ♀ KM-Empfänger in KMT 1 mit KM aus ♂ Spendern rekonstituiert, aus diesem Grund waren im KM ausschließlich Zellen mit ♂ Genotyp zu finden. Die quantifizierten Werte für tdy lagen in allen 5 Ansätzen bei 110 bis 130%, was höchstwahrscheinlich durch starke Varianzen der qPCR bedingt war. Der hohe Prozentsatz der tdy-positiven Zellen deutete allerdings darauf hin, dass das komplette KM durch KMZ der Spender mit ♂ Genotyp rekonstituiert war.



**Abb. 3.54 Quantifizierung viraler Genome und Anteil *tdy*-positiver Zellen aus KM nach KMT 1**

Aus dem KM von 5 latent infizierten KM-Spendern aus KMT 2 (Abb. 3.53) wurde DNA isoliert und in eine *M55/gB*-, *pthrp*- und *tdy*-spezifische qPCR mit dem Plasmid-Standard pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy eingesetzt, um die Anzahl viraler Genome (links) und den Anteil *tdy*-positiver Zellen (rechts) zu quantifizieren. Die viralen Quantifizierungen wurden zweimal, die y-chromosomalen Quantifizierungen einmal jeweils als Triplikate durchgeführt (schwarz). Die Mediane sind rot eingezeichnet. Hellgrau unterlegt sind alle Ansätze, in welchen nach 50 PCR Zyklen keine virale DNA detektierbar war.

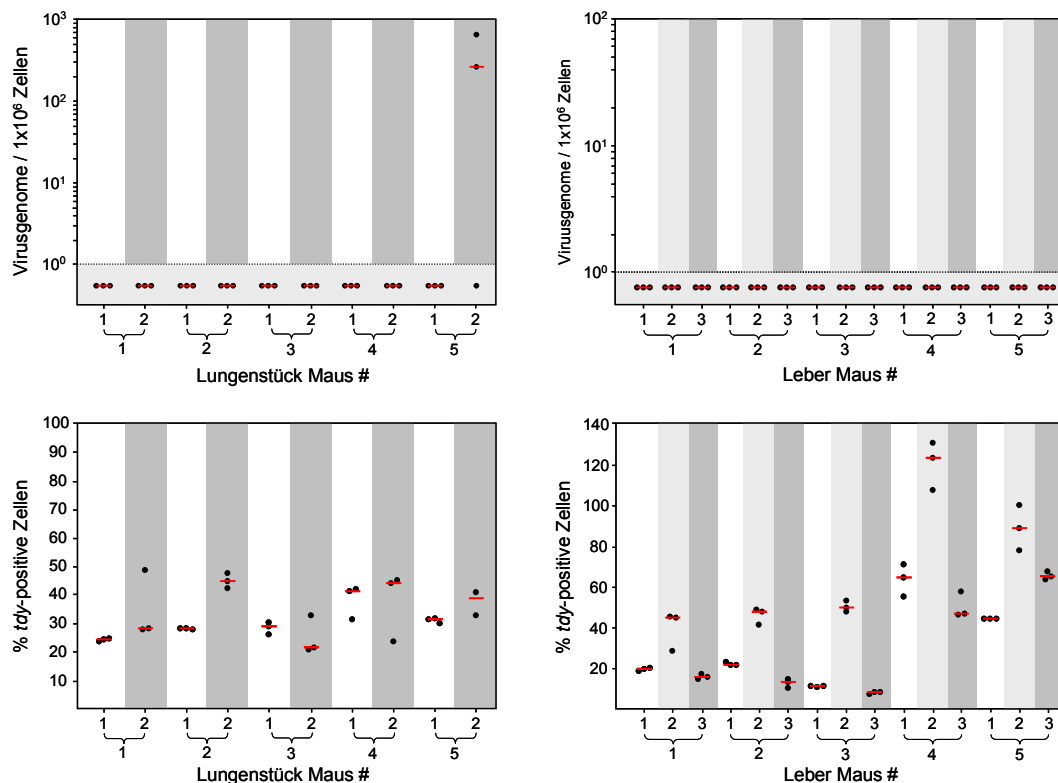
7 Monate nach KMT wurde von den transplantierten Tieren aus der Schwanzvene Blut entnommen (Abb. 3.53), daraus DNA aufgereinigt und die Anzahl der Virusgenome und der Anteil *tdy*-positiver Zellen in einer *M55/gB*-, *pthrp*- und *tdy*-spezifischen qPCR quantifiziert (Abb. 3.55). In keinem der Tiere waren virale Genome nachweisbar. Das KM der Empfänger wurde aus dem KM der Spender komplett rekonstituiert, was am ausschließlich ♂ Genotyp zu erkennen war. Für die fehlende Detektion viraler Genome im Blut gibt es 2 mögliche Erklärungen. Zum einen könnte das Blut nach 7 Monaten, wie unter 3.3 beschrieben, schon wieder völlig von viralen Genomen geklärt sein. Dabei musste die Voraussetzung erfüllt sein, dass KMZ transplantiert wurden, die latente virale Genome enthielten, welche im Empfänger reaktivierten und ihrerseits wieder Latenz ausbildeten. Eine zweite Möglichkeit besteht darin, dass im KM keine latent infizierten Zellen vorhanden sind und somit der Nachweis viraler Genome immer negativ bleibt. In diesem Falle sollten auch die später entnommenen Organe negativ für den Nachweis viraler DNA sein.



**Abb. 3.55 Quantifizierung viraler Genome und Anteil *tdy*-positiver Zellen im Blut latent infizierter Mäuse 7 Monate nach KMT 2**

Sieben Monate nach KMT 2 (Abb. 3.53) wurde Blut von 5 Mäusen entnommen, DNA isoliert und in eine *M55/gB*-, *pthrp*- und *tdy*-spezifische qPCR zur Quantifizierung viraler Genome (rechts) und des Anteils *tdy*-positiver Zellen (links) eingesetzt. Als Standard diente das Plasmid pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy. Alle Ansätze wurden als Triplikate quantifiziert (schwarz) und der Median rot eingezeichnet. Hellgrau unterlegt sind alle Ansätze, in welchen nach 50 PCR Zyklen keine virale DNA detektierbar war.

12 Monate nach KMT wurden aus den 5 Tieren die Lunge und die Leber entnommen (Abb. 3.53). Aus den Lebern wurden getrennt nichtparenchymale Zellen und LSEC aufgereinigt. Zur Detektion viraler Genome und des Anteils *tdy*-positiver Zellen wurde aus Lebern, nichtparenchymalen Zellen, LSEC und den postcavalen Lobi der Lungen aller 5 Mäuse DNA isoliert und diese in eine *M55/gB*-, *pthrp*- und *tdy*-spezifische qPCR eingesetzt. Durch die Quantifizierung konnte die oben beschriebene zweite Möglichkeit bestätigt werden, dass im KM latent infizierter Mäuse keine latent infizierten Zellen vorhanden sind, da in allen getesteten Organen, bzw. Zellen, bis auf zwei positive Werte in einem Lungenstück keine viralen Genome nachgewiesen wurden (Abb. 3.56). Die zwei positiv quantifizierten Werte im Lungenstück #2 von Maus 5 sind höchstwahrscheinlich auf eine Kontamination zurückzuführen, da die Quantifizierungen des anderen Lungenstücks und der restlichen vier Mäuse negativ blieben. Der Anteil *tdy*-positiver Zellen schwankte in der Lunge zwischen 25% und 35%. Innerhalb der Leber wurde der höchste Anteil *tdy*-positiver Zellen wie erwartet in den nichtparenchymalen Zellen nachgewiesen. In der Quantifizierung der gesamten Leber und den isolierten LSEC war der Anteil *tdy*-positiver Zellen vergleichbar hoch.



**Abb. 3.56 Quantifizierung der viralen DNA Load und des Anteils *tdy*-positiver Zellen aus Lunge und Leber 12 Monate nach KMT 2**

Isolierte DNA aus den halbierten postcavalen Lungenlobi (linke Abb.), der Leber, den nichtparenchymalen Zellen und den LSEC (rechte Abb.) wurde in eine *M55/gB*- und *pthrp*-spezifische qPCR zur Quantifizierung der viralen DNA Load und in eine *pthrp*- und *tdy*-spezifische qPCR zur Quantifizierung des Anteils der vom KM-Spender abstammenden Zellen eingesetzt. Als Standard diente das Plasmid pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy. Alle Ansätze wurden als Triplikate gemessen (schwarz) und der jeweilige Median rot eingezeichnet. Die jeweils halbierten Lungenlobi in der linken Abb. sind mit 1 und 2 gekennzeichnet, in der rechten Abb. sind die Lebern unter 1, die nichtparenchymalen Zellen unter 2 und die LSEC unter 3 dargestellt. Hellgrau unterlegt sind alle Ansätze, in welchen nach 50 PCR Zyklen keine virale DNA nachweisbar war.



### Zusammenfassung

Im Gegensatz zu den hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen bei latenter hCMV-Infektion (Kondo et al., 1994; Hahn et al, 1998; Slobedman & Mocarski, 1999) konnte durch die Untersuchung von geschlechtschromosomalen Chimären bewiesen werden, dass die KMZ der Maus kein Reservoir latenter mCMV Genome sind. Demzufolge ist es sehr unwahrscheinlich, dass aus hämatopoetischen Progenitorzellen differenzierte Zellfraktionen als Ort latenter mCMV Infektion in Frage kommen. Da somit alle Zellen hämatopoetischen Ursprungs als Träger latenter viraler Genome ausscheiden, bleiben ausschließlich die stromal/parenchymalen Zellen als Ort der mCMV Latenz übrig.

Durch diese hier durchgeführten KMT-Versuche konnte des Weiteren erstmals gezeigt werden, dass mCMV durch den Transfer von KMZ aus latent infizierten Spendern in immunsupprimierte Empfänger nicht übertragen wird.

## 4 Diskussion

Die Reaktivierung von latentem Cytomegalovirus ist verantwortlich für eine signifikante Morbidität und Mortalität von immunsupprimierten Individuen wie beispielsweise Empfängern von Organtransplantaten. Ein Problem bei der Untersuchung der Reaktivierungsprozesse ist, dass die zellulären Latenzorte von mCMV und von hCMV, seit über 3 Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung (Shanley et al., 1979; Jordan, 1983), bislang noch nicht eindeutig bekannt sind. Für mCMV wurde der Nachweis viraler DNA in den Endothelien von Leber und Niere, in Makrophagen der Lunge und im Knochenmark erbracht, jedoch wurden keine viralen Transkripte in den getesteten Organen nachgewiesen (Koffron et al., 1998). Somit konnte nicht bewiesen werden, dass die detektierte virale DNA in einem Zustand der Latenz vorliegt, aus dem eine Reaktivierung hervorgerufen werden kann. In gesunden seropositiven Individuen konnte hCMV DNA hauptsächlich in Zellen der myeloiden Reihe wie beispielsweise Monozyten nachgewiesen werden (Taylor-Wiedeman et al., 1991; Larsson et al., 1998). Auch in diesen Untersuchungen konnte trotz Detektion viraler DNA keine virale Genexpression nachgewiesen werden (Taylor-Wiedeman et al., 1994; Mendelson et al., 1996). Die hier vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Klärung der Frage liefern, welche zellulären Fraktionen in der murinen Leber latente virale Genome enthalten. Dabei soll sich der Nachweis nicht nur auf die Detektion viraler DNA in den einzelnen Zellpopulationen beschränken, es soll vielmehr bewiesen werden, dass sich die in den Leberkompartimenten vorliegenden Virusgenome in einem per Definition latenten Zustand befinden, aus dem eine Reaktivierung induziert und eine produktive Infektion ausgebildet werden kann.

### Wahl der Aufreinigungs- und Separationstechniken

Zur Isolierung nichtparenchymaler Zellen aus der Leber wurden zwei unterschiedliche Perfusionsmedien verwendet. Für die Zelltrennungen mittels zentrifugaler Elutriation wurde die Leber mit einem kollagenasehaltigen calciumfreien Medium (*Ca<sup>2+</sup> deprived Medium*) perfundiert (Knolle et al., 1996), wodurch das entnommene Organ jedoch nicht genügend verdaut wurde, was an der festen Konsistenz der Leber erkennbar war. Durch diese Festigkeit war es sehr schwierig, die Leber quantitativ zu einer homogenen Masse auszustreichen, woraus eine stark verringerte Ausbeute nichtparenchymaler Zellen resultierte. Die Verwendung des calciumfreien Perfusionsmediums sollte die durch *tight junctions* und *adherens junctions* vermittelten Zell-Zell Kontakte lösen (Übersicht: Denker & Nigam, 1998), allerdings benötigt die Kollagenase als Kofaktor Calcium (Seifter & Harper, 1970) und ist in calciumfreiem Medium sehr stark in ihrer Aktivität beeinträchtigt. Optimalerweise sollte analog zur Hepatozytenisolierung eine 2-Schritt Perfusion, einmal ohne Calcium und einmal mit Calcium und Kollagenase durchgeführt werden (Seglen, 1972). Allerdings birgt dies die Gefahr, dass durch die lange Perfusionszeit zu viele nichtparenchymale Zellen, wie beispielsweise Kupffer Zellen, ausgespült werden. Der Perfusionspuffer wurde daraufhin durch einen calciumhaltigen Puffer (GBSS) ersetzt (Knook & Sleyster, 1976), der wie der calciumfreie Puffer mit 0,05% Kollagenase versetzt war. Nach 20 Sekunden Perfusion und anschließender Entnahme hatte die Leber eine weichere

Konsistenz und konnte so mit zwei Pinzetten optimal ausgestrichen werden. Die Perfusion mit kollagenasehaltigem Puffer und der anschließende Kollagenaseverdau sind von Nachteil in darauf folgenden FACS Analysen, da durch die Behandlung mit Kollagenase im FACS starke Autofluoreszenzen entstehen (Ades et al., 1989). Dieser Effekt könnte minimiert werden, wenn die Leber lediglich mit PBS perfundiert wird (Lian et al., 2003), doch wirkt sich diese Methode negativ auf die Gesamtzahl der isolierten Zellen aus.

In dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche Separationstechniken zur Trennung der einzelnen Leberzellfraktionen verwendet: die zentrifugale Elutriation, die immunomagnetische (MACS) Aufreinigung und die zytofluorometrische Trennung (Übersicht: Bauer, 1999). Jede dieser drei Techniken hat Vor-, aber auch Nachteile. Durch die zentrifugale Elutriation werden Zellen aufgrund ihrer Größe und Dichte getrennt. Da sich die verschiedenen Zellen in der Leber sowohl in ihrer Dichte als auch in ihrer Größe überschneiden (Alpini et al., 1994), ist eine quantitative Trennung einzelner Fraktionen nicht möglich. Der Vorteil der Elutriation ist, dass durch die Aufreinigung der physiologische Zustand der Zellen nicht verändert wird, da diese nicht mit Antikörpern (Ak), deren Interaktion intrazelluläre Signaltransduktionswege aktivieren und damit den Phänotyp der Zellen ändern kann, inkubiert werden. Demgegenüber stehen die immunomagnetische Aufreinigung und die zytofluorometrische Trennung. Bei beiden Separationstechniken müssen die Zellen mit Ak inkubiert werden, doch können dadurch quantitativ einzelne Zellfraktionen der Leber isoliert werden. Da mit diesen Techniken auch minore Populationen aus der Leber isoliert werden konnten, waren die Ak-vermittelten Separationen für den größten Teil der Experimente das Mittel der Wahl.

## Die Leber als Ort von mCMV Latenz und Reaktivierung

In der hier vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Leber einen Ort der Viruslatenz darstellt, da in allen Quantifizierungen isolierter DNA aus latent infizierter Leber virale Genome detektiert werden konnten. Frühere Arbeiten konnten dadurch bestätigt werden, in denen sowohl mCMV DNA (Collins et al., 1993; Koffron et al., 1995; Bevan et al., 1996; Koffron et al., 1998) als auch hCMV DNA (Hendrix et al., 1996; Hendrix et al., 1997; Koffron et al. 1997) in der Leber mittels PCR nachgewiesen wurde. Im Gegensatz zu anderen Organen wie der Lunge oder der Milz ist die quantifizierte virale DNA *Load* in der Leber latent infizierter Mäuse allerdings immer erniedrigt. Diese Unterschiede in der Menge viraler Genome korrelieren nicht mit dem Anteil hämatopoetischer, also vom KM-Spender abstammenden (*tdy*-positiven) Zellen in den einzelnen Organen, da beispielsweise in der Milz, die den höchsten Anteil an Zellen hämatopoetischen Ursprungs enthält, nicht gleichzeitig die höchste Anzahl viraler Genome nachzuweisen ist. Im Gegensatz dazu liegt der Anteil *tdy*-positiver Zellen in der Lunge, in der die größte Menge viraler Genome nachgewiesen werden kann, zwischen dem der Milz und der Leber. Der prozentuale Anteil hämatopoetischer Zellen ist in der Leber im Vergleich zur Lunge und Milz am niedrigsten, da die Fraktion der Hepatozyten ungefähr 70% der Gesamtzellen in der Leber repräsentiert und die Hälfte der verbleibenden 30% der nichtparenchymalen Zellen LSEC sind. Dies bedeutet, dass nur maximal 15% der Leberzellen hämatopoetischen Ursprungs sind. Die Leber besitzt

jedoch, bedingt durch ihre Größe, mit den Kupffer Zellen mengenmäßig den höchsten Anteil sessiler Makrophagen im gesamten Körper (Übersicht: Racanelli & Rehermann, 2006). Die Funktionalität der latenten mCMV Genome in der Leber konnte durch die Kultivierung von Leberexplantaten und zur Kontrolle von Lungen- und Milzexplantaten, die regelmäßig auf Reaktivierung von latentem mCMV getestet wurden, bewiesen werden. Kokultivierungen verschiedener Organe bzw. Organhomogenate zusammen mit MEF wurden schon in früheren Arbeiten beschrieben, allerdings fokussierten sich diese auf Milz (Mayo et al., 1978; Wise et al., 1979; Jordan et al., 1982; Pollock & Virgin IV, 1995; Koffron et al., 1998; Presti et al., 1998; Henry et al., 2000), Lunge (Presti et al., 1998; Henry et al., 2000) oder Niere (Porter et al., 1985; Pollock & Virgin IV, 1995). Die Reaktivierung aus Leberexplantaten hingegen wurde bislang nur einmal untersucht (Olding et al., 1976), wobei in keinem der Versuche eine Reaktivierung durch Kokultivierung erzielt werden konnte. Mit dem in dieser Arbeit durchgeführten Versuch konnte in allen Ansätzen der als Positivkontrolle kultivierten Lungenstücke nach maximal 8 Wochen eine mCMV Reaktivierung nachgewiesen werden, was sowohl mit der erhöhten viralen DNA *Load* in der Lunge der einzelnen Tiere, als auch mit der Literatur, in der die Lunge einen Hauptort von mCMV Latenz und Reaktivierung darstellt (Baltesen et al., 1993), konsistent ist. Im Gegensatz zur Lunge konnte eine Reaktivierung aus den kultivierten Leberstücken nur in einem geringen Anteil der getesteten Ansätze nachgewiesen werden (1 bis maximal 5 positive Ereignisse pro 24 Ansätze), was durch die verminderte virale DNA *Load* um bis zu einer  $\log_{10}$  Stufe in der gesamten Leber im Vergleich zur Lunge zu erklären ist. Interessanterweise wurden die ersten Reaktivierungsereignisse aus der Leber erst 1,5 bis 2,5 Wochen nach Kultivierung detektiert, während in den Explantkulturen der Lunge und der Milz schon nach einer Woche einzelne Reaktivierungsereignisse erkennbar waren. Möglicherweise spielen hier ebenfalls die geringe Anzahl viraler Genome in der Leber und die damit verbundenen reduzierten Reaktivierungsereignisse in den Explantaten eine Rolle, da mit abnehmender Zahl der Reaktivierungsereignisse höchstwahrscheinlich die Dauer der Inkubationszeit, die benötigt wird, um infektiöses Virus nachzuweisen, zunimmt.

## Hepatozyten sind kein Latenzort von mCMV

In aufgereinigten Hepatozyten aus latent infizierten Mäusen konnte mittels qPCR nachgewiesen werden, daß die Hepatozyten keinen Ort der mCMV Latenz darstellen. Die Hepatozyten stammen als parenchymale Zellen vom KM-Empfänger ab, was am verringerten Anteil *tdy*-positiver Zellen von 0,5% bis 2% im Vergleich zur gesamten Leber, in welcher zwischen 10% bis 30% der Zellen *tdy*-positiv sind, erkennbar ist. Dieser geringe Prozentsatz in der Hepatozytenfraktion ist höchstwahrscheinlich durch die Kontamination mit Zellen hämatopoetischen Ursprungs wie beispielsweise Kupffer Zellen bedingt. Andererseits kann anstelle der Kupffer Zellen eine Repopulation von Hepatozyten, die auch aus hämatopoetischen Zellen des KM gebildet werden können (Lagasse et al., 2000), nicht ausgeschlossen werden. Zudem konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass nach strahlungsbedingter Immunsuppression und anschließender KMT mit KM aus männlichen Spendern in weibliche Empfänger auch in den KM-Empfängern Hepatozyten nachweisbar sind, die den Genotyp des KM-Spenders besitzen (Theise et al., 2000a). Der prozentuale

Anteil der vom Spender abstammenden Hepatozyten betrug in den von Theise und Kollegen (2000a) durchgeführten Untersuchungen - analog zu den oben beschriebenen Ergebnissen dieser Arbeit - ebenfalls maximal 2%. Eine genaue Identifizierung des vom Spender abstammenden Zelltyps in der Hepatozytenfraktion wurde nicht vorgenommen, da die Fraktion der Hepatozyten wie beschrieben kein Latenzort von mCMV ist.

Im Gegensatz zur latenten Infektion sind die Hepatozyten während der akuten hCMV (Sinzger et al., 1999) und der akuten mCMV (Ruebner et al., 1964) Infektion ein Hauptort der viralen Replikation in der Leber. In früheren Arbeiten konnte demonstriert werden, dass virale Infektionen wie eine Adenovirus (Arai et al., 2002) oder Hepatitis C Virus (Apolinario et al., 2005) Infektion die Sekretion von Chemokinen wie beispielsweise CXCL9 (Mig) oder CXCL10 (IP-10) aus Hepatozyten induziert. Die sezernierten Chemokine binden auf extrazellulären Matrizes oder Zelloberflächen (Übersicht: Moser et al., 2004), wo sie von CXCR3 Rezeptoren, die sich in hoher Zahl auf aktivierten T-Zellen befinden (Loetscher et al., 1996; Übersicht: Murdoch & Finn, 2000), erkannt werden. Diese Erkennung führt während einer akuten mCMV Infektion zu einer spezifischen Akkumulation mCMV-spezifischer CD8 T-Zellen in der Leber (Hokeness et al., 2007). Die akkumulierten T-Zellen können nach Bindung der CXCR3 Rezeptoren an die CXCL9 oder CXCL10 Liganden, die sich während Entzündungsreaktionen auch in großer Zahl auf Endothelzellen befinden (Shields et al., 1999; Übersicht: Lalor et al., 2002; Übersicht: Knolle & Limmer, 2003b), durch das Endothel migrieren (Curbishley et al., 2005) und so mCMV-infizierte Hepatozyten lysieren. Diese Migration kann nur zwischen mikrovaskulären Endothelzellen und nicht zwischen LSEC stattfinden, da diese als diskontinuierliches Endothel keine *tight junction* vermittelten Zell-Zell Kontakte ausbilden (Warren et al., 2006). Der Kontakt zwischen T-Zellen und Hepatozyten innerhalb der Sinusoide kann durch die Fenestrierungen der LSEC hergestellt werden. Diese Interaktionen finden über zytoplasmatische Fortsätze der Lymphozyten statt, die in den Dissé'schen Raum eindringen und mit den Mikrovilli der Hepatozyten in Berührung kommen (Warren et al., 2006; Warren et al., 2007). In immunkompetenten Individuen kann die akute mCMV Infektion in den Hepatozyten der Leber auf diese Weise effizient kontrolliert werden. Diese effiziente Kontrolle bedingt höchstwahrscheinlich, dass Hepatozyten keinen geeigneten Latenzort für mCMV darstellen.

## **Nichtparenchymale Leberzellen als Latenzort von mCMV**

In früheren Arbeiten wurden Hinweise erbracht, dass latentes mCMV Genom in Epithelzellen (Klotman et al., 1990), Endothelzellen (Koffron et al., 1998), Makrophagen (Brautigam et al., 1979; Pollock et al., 1997; Koffron et al., 1998), Monozyten (Mitchell et al., 1996), polymorphkernigen Leukozyten (Mitchell et al., 1996), B-Lymphozyten (Olding et al., 1975; Jordan & Mar, 1982) und Zellen im Stroma der Milz (Pomeroy et al., 1991), die möglicherweise sinusoidale Endothelzellen sind (Mercer et al., 1988), lokalisiert ist.

Untersuchungen nichtparenchymaler Zellen der Leber aus latent infizierten Mäusen mittels zentrifugaler Elutriation bestätigten, dass latente mCMV Genome in der Endothelzellfraktion angereichert sind. Unabhängig davon konnte in dieser Arbeit auch mit immunologischen Methoden nachgewiesen werden, dass die Endothelzellen der Leber Träger latenter viraler Genome sind, da virale DNA in zellulären Fraktionen, die positiv für den Endothelzellmarker

CD31 sind, detektiert wurde. Das Adhäsionsmolekül CD31, das zur Immunglobulin Superfamilie gehört (Newman et al., 1990), wird nicht nur auf Endothelzellen, sondern auch auf Leukozyten exprimiert (Ayalon et al., 1994), die allerdings aufgrund ihres unterschiedlichen Genotyps - bedingt durch die getrenntgeschlechtliche KMT mit männlichen KM-Spendern und weiblichen KM-Empfängern - voneinander differenziert werden können. Durch diese Unterscheidung konnte auf genomischer Ebene eine Kontamination der latent infizierten Endothelzellfraktion mit Leukozyten ausgeschlossen werden.

Sowohl durch zentrifugale Elutriation als auch durch immunomagnetische Separation konnte bewiesen werden, dass die Menge latenter viraler Genome in Kupffer Zellen und anderen myeloiden und lymphatischen Zellen wie T- und B-Lymphozyten, NK-Zellen und DCs in der Leber sehr stark verringert ist bzw. überhaupt keine viralen Genome mehr nachweisbar sind. Die Detektion noch vorhandener viraler Genome in einzelnen Fraktionen ist dabei höchstwahrscheinlich auf eine Kontamination mit latent infizierten Endothelzellen, bedingt durch die nicht-quantitative Abtrennung der virusgenomtragenden Zellen, zurückzuführen. Zellen hämatopoetischen Ursprungs sind somit in der Leber kein Latenzort von mCMV. Dieser Befund ist konsistent mit der Beobachtung aus früheren Arbeiten, dass im KM von latent infizierten Mäusen ebenfalls sehr wenige bis überhaupt keine latenten viralen Genome nachweisbar sind, da die virale DNA nach einer Primärinfektion zuerst aus dem KM und später aus den intravaskulären Lymphozyten geklärt wird, während sie lebenslang in Organen nachweisbar bleibt (Balthesen et al., 1994b; Reddehase et al. 1994; Kurz et al., 1997; Kurz et al., 1999). Das Argument, dass latent infizierte Zellen des KM, die für die Weitergabe viraler Genome in hämatopoetischen Zellen verantwortlich sein müssen, unterhalb der Detektionsgrenze der qPCR liegen und so trotz fehlender Detektion die Latenz in hämatopoetischen Zellen aufrechterhalten, kann in der vorliegenden Arbeit eindeutig widerlegt werden, da nach KMT aus latent infizierten Spendermäusen in nicht infizierte, immunsupprimierte Empfängerermäuse weder in der Lunge noch in der Leber eine Viruslatenz, die durch Reaktivierung oder nach klonaler Expansion latent infizierter Zellen hämatopoetischen Ursprungs entstehen kann, ausgebildet wird.

Mögliche Kandidaten, die als Ort einer latenten Infektion in Frage kommen, sollten langlebige Zellen sein. Dies ist ein weiterer Grund, warum die Kupffer Zellen als Latenzort ausgeschlossen werden können, da differenzierte Kupffer Zellen in der Maus eine kalkulierte Lebensdauer von nur etwa 4 Tagen besitzen (Übersicht: Naito et al., 2004). Untersuchungen ergaben, dass die gesamte Kupffer Zell Population der Maus nach ihrer Entfernung innerhalb von 14 Tagen wieder rekonstituiert (Yamamoto et al., 1996) oder nach KMT innerhalb von 14 bis 21 Tagen durch Zellen des Spenders ersetzt wird (Paradis et al., 1989; Übersicht: Naito et al., 2004). Über das Schicksal der Kupffer Zellen ist bisher wenig bekannt. Da apoptotische Zellen effizient von Kupffer Zellen oder anderen Makrophagen erkannt werden, besteht die Möglichkeit, dass apoptotische Kupffer Zellen von benachbarten Kupffer Zellen erkannt und phagozytiert werden (Übersicht: Naito et al., 2004). Im Gegensatz zu den Kupffer Zellen besitzen Endothelzellen eine längere Lebensdauer. Nachdem sie mehrere Zellteilungen durchlaufen haben, können sie in adulten Individuen in einen Ruhezustand übergehen, der Seneszenz genannt wird (Yang et al., 1999). Aus diesem Ruhezustand können sie beispielsweise durch virusvermittelte Entzündungsreaktionen wieder aktivieren, was in erneuter Proliferation, Sekretion von Cytokinen oder Expression von Adhäsionsmolekülen wie CD106 resultiert (Übersicht: Cines et al., 1998). Eine weitere

bemerkenswerte Eigenschaft der Endothelzellen ist die Transdifferenzierung, also die Änderung des konstitutiven Phänotyps der Zellen, der in Abhängigkeit des Mikromilieus reguliert wird (Übersicht: Augustin et al., 1994). Dies bedeutet allerdings auch, dass sich der organspezifische Phänotyp der Endothelzellen beispielsweise nach Isolierung und Kultivierung stark verändern kann.

### **Endothelzellen der Leber als Träger latenter mCMV Genome**

Da latente mCMV DNA bisher ausschließlich in Endothelzellen kleiner Gefäße oder Kapillaren nachgewiesen werden konnte (Koffron et al., 1998), wurde ein Ak (ME-9F1 Klon) verwendet, der spezifisch für die Endothelzellen der Lebersinusoide (LSEC) ist (Harder et al., 1991). Mit diesem Ak war es möglich, aus der nichtparenchymalen Fraktion immunomagnetisch oder zytofluorometrisch spezifisch LSEC zu isolieren. In der LSEC Fraktion konnte mittels qPCR mCMV DNA detektiert werden. Dabei blieb die Menge viraler Genome in der LSEC Fraktion im Vergleich zur nichtparenchymalen Fraktion mindestens gleich oder stieg allenfalls leicht an, da ungefähr 40 bis 50% der nichtparenchymalen Zellen LSEC sind und so nur eine Anreicherung um den Faktor 2 bis 3 erreicht werden konnte. Parallel zur Anreicherung latent infizierter LSEC nahm der Anteil der Zellen hämatopoetischen Ursprungs ab. Damit konnten die Endothelzellen der Lebersinusoide erstmals eindeutig als Latenzort für mCMV identifiziert werden.

Für die hCMV Infektion sind Endothelzellen als Latenzort allerdings noch umstritten. Obwohl frühere Befunde hCMV DNA in vaskulären Strukturen der Arterien detektierten (Hendrix et al., 1991; Melnick et al., 1994), werden vaskuläre Endothelzellen als Latenzort für hCMV kontrovers diskutiert. Pampou und Kollegen (2000) konnten mittels PCR und endothelzellspezifischer Ak zeigen, dass die Endothelzellen der Arterien ein Zelltyp sind, der mit hCMV infiziert sein kann. Dagegen konnten Reeves und Kollegen (2004) in venösen Endothelzellen keine hCMV DNA nachweisen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass sich Endothelzellen aus verschiedenen Kompartimenten des Körpers aufgrund ihrer Diversität auch sicherlich in ihrer Suszeptibilität für hCMV unterscheiden (Übersicht: Jarvis & Nelson, 2007), was angesichts der konsistenten Identifizierung von hCMV in arteriellen Gefäßen in mehreren Studien im Gegensatz zu den hCMV Untersuchungen an venösen Gefäßen bestätigt werden kann.

Ein weiterer Hinweis, dass stromal/parenchymale Strukturen wie Endothelzellen neben Zellen hämatopoetischen Ursprungs als Latenzort für hCMV in Frage kommen, ist die Beobachtung, dass eine latente hCMV Infektion durch KMT aus seropositiven Spendern in seronegative Empfänger seltener übertragen wird (Boeckh & Bowden, 1995), während die hCMV Übertragung aus seropositiven Spendern in seronegative Empfänger durch die Transplantation solider Organe wie der Leber häufig auftritt (Wiesner et al., 1993; Goodrich et al., 1994; Emery, 2001; Übersicht: Pass, 2001). Nach orthotoper Lebertransplantation aus seropositiven Spendern in seropositive oder seronegative Empfänger konnte eine hCMV Infektion immunhistochemisch vorwiegend in Hepatozyten, aber auch in den Endothelzellen der Lebersinusoide detektiert werden (Bissinger et al., 2004).

Nachdem latente virale mCMV Genome in den LSEC nachgewiesen werden konnten, wurden die Zellen phänotypisch aufgrund ihrer Expression von Oberflächenrezeptoren

charakterisiert. Hier ergaben FACS Messungen, dass nahezu alle (98%) isolierten LSEC positiv für CD31 sind. Ein geringer Prozentsatz der LSEC (5-6%) ist positiv für MHC Klasse II und CD11b. Die Oberflächenantigene CD45R, CD11c und CD4 konnten auf LSEC nicht nachgewiesen werden. Die Expression von CD106 (VCAM-1) auf LSEC wurde nicht mehr getestet, da innerhalb der gesamten nichtparenchymalen Fraktion nur eine sehr geringe CD106 Expression detektiert werden konnte.

Die Expression von CD31 in aufgereinigten latent infizierten LSEC ist konsistent mit den Ergebnissen der immunomagnetischen Aufreinigung, in der CD31 positive Zellen als Ort latenter mCMV Genome detektiert wurden. Allerdings wird die Expression von CD31 auf LSEC in der Literatur kontrovers diskutiert. CD31 ist als Adhäsionsmolekül auf Endothelzellen zwischen den Zell-Zell Verbindungen lokalisiert, da die LSEC, die ein diskontinuierliches Endothel ausbilden, keine *tight junctions* besitzen, wird CD31 auf den LSEC im Vergleich zu anderen vaskulären Endothelien nur sehr gering exprimiert (Übersicht: Lalor et al., 2002). Deshalb konnte mit immunhistochemischen Untersuchungen *in situ* auf LSEC keine CD31 Expression nachgewiesen werden (Scoazec & Feldmann, 1991; Übersicht: Scoazec & Feldmann, 1994). Dieser Befund bestätigte sich für isolierte LSEC, jedoch wurde gezeigt, dass die Expression von CD31 durch eine Kultivierung isolierter LSEC induzierbar ist (DeLeve et al., 2004). Parallel zur Expression von CD31 in kultivierten LSEC konnte ein Rückgang in der Zahl der Fenestrierungen der LSEC beobachtet werden (DeLeve et al., 2004). Da die Expression von CD31 reziprok zur Anzahl der Fenestrierungen auf LSEC ist (DeLeve et al., 2004) und die Menge der Fenestrierungen auf LSEC, die immunomagnetisch isoliert wurden, im Vergleich zu zentrifugal isolierten LSEC geringer sind (DeLeve et al., 2006), kann die Expression von CD31 sehr stark von der jeweils verwendeten Aufreinigungsmethode abhängig sein. Für diese Annahme spricht, dass mehreren Gruppen der Nachweis von CD31 auf immunomagnetisch oder zytofluorometrisch isolierten LSEC ohne vorherige Kultivierung gelang (Do et al., 1999; Katz et al., 2004; Nonaka et al., 2004). Die Diskrepanzen in den Untersuchungen des Phänotyps der LSEC können möglicherweise auch durch das Vorhandensein unterschiedlicher LSEC Populationen entstanden sein. Die LSEC sind in 2 Populationen unterteilt, in Typ-1 (*liver endothelial cells type-1*, LEC-1) und Typ-2 (*liver endothelial cells type 2*, LEC-2) Leberendothelzellen (Barberá-Guillem et al., 1991; Vidal-Vanaclocha et al., 1993). In der Leber sind die LEC-1 im periportalen Feld und die LEC-2 im perivenösen Feld lokalisiert (Cardier & Barberá-Guillem, 1997). Obwohl in beiden Populationen eine CD31 Expression zu sehen ist (Cardier & Barberá-Guillem, 1997), unterscheiden sie sich deutlich in der Menge der Fenestrierungen (Dini & Carlà, 1998) und ihrer Größe (Morin et al., 1984). Während die LSEC im periportalen Feld (LEC-1) vergleichsweise wenig Fenestrierungen besitzen, sind die LSEC im perivenösen Feld (LEC-2) sehr stark fenestriert.

Die Expression von CD11b (Knolle et al., 1999) auf LSEC und MHC Klasse II auf Zellen, die die Lebersinusoide auskleiden (Rubinstein et al., 1986), wurde in früheren Arbeiten nachgewiesen. Dies konnte durch die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse nicht bestätigt werden, da nur ein geringer Anteil von 5% der isolierten LSEC positiv für CD11b und MHC Klasse II war, die restlichen 95% der LSEC blieben negativ. Rubinstein und Kollegen (1986) verwendeten für ihre Versuche isolierte Fraktionen aus der Leber, die sowohl LSEC als auch Kupffer Zellen enthielten, deshalb ist der MHC Klasse II Nachweis mit Sicherheit auf die in der Fraktion enthaltenen Kupffer Zellen zurückzuführen. Der ME-9F1



Ak, der in der hier vorliegenden Arbeit zur immunomagnetischen Aufreinigung der LSEC verwendet wurde, wurde lediglich für LSEC und glatte Muskelzellen positiv getestet (Harder et al. 1991), wobei in den Isolierungen keine glatten Muskelzellen zu finden sind, da diese weder CD31 positiv sind, noch AcLDL aufnehmen. Es besteht deshalb die Möglichkeit, dass die isolierte CD11b und MHC Klasse II positive Fraktion eventuell einen anderen Zelltyp als Endothelzellen darstellt, obwohl die Zellen ebenfalls positiv für den endothelzellspezifischen Marker CD31 sind. Ebenfalls für einen anderen Zelltyp spricht, dass die CD11b/MHC Klasse II Fraktion auf genomischer Ebene positiv für *tdy* ist, was bedeutet, dass die Zellen hämatopoetischen Ursprungs sind. LSEC aber sind, was sowohl durch Literatur (Limmer et al., 2000) als auch durch verschiedene Versuche, in denen der Anteil *tdy*-positiver Zellen in der LSEC Fraktion immer stark abgereichert war, belegt ist, keine Zellen hämatopoetischen Ursprungs. Die Frage nach einem anderen Zelltyp kann auch nach der Klärung des Genotyps nicht beantwortet werden, da Endothelzellen ebenfalls vom KM abstammen können. Dies konnte vorwiegend in Transplantationsversuchen gezeigt werden, da beispielsweise nach Lebertransplantation das venöse Endothel durch Endothelzellen des Empfängers besiedelt werden kann (Gao et al., 2001) oder nach KMT in der Leber des Empfängers vom Spender abstammende sinusoidale Endothelzellen detektiert werden können (Bailey et al., 2004). KMZ können auch nach partieller Hepatektomie in der Leber zu sinusoidalen Endothelzellen differenzieren und sind so direkt in die Regeneration der Leber involviert (Fujii et al., 2002). Möglicherweise existieren auch sogenannte CD34<sup>+</sup> zirkulierende endotheliale Progenitorzellen hämatopoetischen Ursprungs, die hauptsächlich für die Angiogenese, aber auch für die postnatale Vaskulogenese verantwortlich sein können (Asahara et al., 1997; Asahara et al., 1999). In isolierten Fraktionen der MHC Klasse II-positiven LSEC nimmt die Anzahl viraler Genome bei zunehmendem Anteil *tdy*-positiver Zellen stetig ab, womit erneut bewiesen wurde, dass Zellen hämatopoetischen Ursprungs keine Träger latenter viraler Genome sind.

Wie schon für CD31 beschrieben, wird auch die Expression von CD4 und CD11c auf LSEC kontrovers diskutiert. In dieser Arbeit konnten weder CD4 noch CD11c Oberflächenantigene auf immunomagnetisch isolierten LSEC nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang zu Katz und Kollegen (2004), welche nach immunomagnetischer Aufreinigung der LSEC ebenfalls weder eine CD4 noch eine CD11c Expression detektierten. Im Gegensatz dazu wurden mittels Immunhistochemie eine CD4 (Scazecz & Feldmann, 1990) und nach zentrifugaler Elutration zytofluorometrisch eine CD11c (Knolle et al., 1999) Expression auf LSEC bestätigt.

Obwohl von CD106 Expressionen auf LSEC berichtet wurde (Übersicht: Knolle & Gerken, 2000), ist auf „naiven“ LSEC unter nicht pathologischen Bedingungen kein CD106 nachweisbar (Übersicht: Scazecz & Feldmann, 1994). Dies ist konsistent mit der Beobachtung, dass auf entzündeten LSEC oder allgemein auf entzündetem Leberendothel die Expression von CD106 induziert wird, um zirkulierenden Lymphozyten eine Adhäsion zu ermöglichen (Übersicht: Lalor et al., 2002). In latent infizierten Mäusen, die weder akute noch chronische Entzündungen aufweisen, ist der Nachweis von CD106 innerhalb der nichtparenchymalen Zellfraktion nicht möglich.

Eine Erklärung für alle hier diskutierten Unterschiede in der Expression von Oberflächenrezeptoren auf LSEC, die sehr wahrscheinlich in erster Linie von den spezifischen Methoden der Aufreinigung und der Kultivierung abhängig sind, ist der bereits

oben beschriebene Effekt der Transdifferenzierung von Endothelzellen. Die LSEC sind sessile Endothelzellen, die an ihre lokale Umgebung adaptieren können, um ihre metabolischen Funktionen optimal zu erfüllen (Übersicht: Augustin et al., 1994). Dies impliziert, dass ein Wechsel des sie umgebenden Mikromilieus, beispielsweise durch Aufreinigung oder Kultivierung, mit einer signifikanten Änderung des Phänotyps verbunden ist.

## Frequenz latenter mCMV Genome in LSEC

Durch Berechnungen der Frequenzen latent infizierter LSEC konnte erstmals gezeigt werden, dass sich eine latent infizierte Zelle in  $1,89 \times 10^4$  LSEC mit einem 95%igen Konfidenz-Intervall zwischen minimal  $1,16 \times 10^4$  und maximal  $3,08 \times 10^4$  LSEC befindet. Diese Ergebnisse können mit den Daten aus jeweils einer Untersuchung der latenten mCMV und der latenten hCMV Infektion anderer Arbeitsgruppen verglichen werden. Allerdings wurden diese Untersuchungen nicht an latent infizierten Endothelzellen sondern ausschließlich an latent infizierten Zellen hämatopoetischen Ursprungs durchgeführt (Pollock et al., 1997; Slobedman & Mocarski, 1997). In latent infizierten Mäusen konnte nach Peritoneallavage eine latent infizierte Zelle pro  $4 \times 10^4$  bis  $5 \times 10^4$  PECs (*peritoneal exudate cells*) identifiziert werden (Pollock et al., 1997). Die Frequenzen latent infizierter PECs waren etwas geringer als die Frequenzen latent infizierter LSEC, was höchstwahrscheinlich auf die unterschiedlichen latent infizierten Zelltypen zurückzuführen ist. Für die latente hCMV Infektion wurde aus mononukleären Zellen von KM-Spendern eine Frequenz von einer latent infizierten Zelle in  $1,1 \times 10^4$  Zellen berechnet (Slobedman & Mocarski, 1999), was trotz des unterschiedlichen Zelltyps mit den Frequenzen latent infizierter LSEC in dieser Arbeit übereinstimmt.

In isolierten LSEC aus latent infizierten Mäusen befanden sich in einer latent infizierten Zelle 11 virale Genome mit einem 95%igen Konfidenz-Intervall zwischen 7 und 19 viralen Genomen. Pollock und Kollegen (1997) untersuchten die Kopienzahlen viraler Genome in PECs oder im KM latent infizierter Mäuse, die eine Anzahl von 1 bis 4 Virusgenomen in einer PEC und 1 bis 5 Virusgenomen in einer KMZ ergaben. Die Menge der Virusgenome pro latent infizierter PEC oder KMZ ist etwas geringer als in den LSEC, allerdings schätzen Pollock und Kollegen (1997), dass in einem latent infizierten Makrophagen 1 bis 10 virale Genome vorhanden sind, was konsistenter mit den hier erhaltenen Daten für die LSEC ist. Die Ergebnisse von Slobedman & Mocarski (1999), die durch quantitative kompetitive PCR eine Kopienzahl von 2 bis 13 Virusgenomen pro latent infizierte KMZ errechneten, überschneiden sich ebenfalls mit der Anzahl latenter viraler Genome in LSEC.

Die geringe Anzahl viraler Genome in einer latent infizierten Zelle ist ein weiterer Beweis für das Vorliegen einer Viruslatenz (Kurz et al., 1997) und keiner gering persistierenden Infektion. Während einer akuten mCMV Infektion sind in der Milz immunsupprimierter Mäuse 10 Tage nach Infektion ungefähr  $1 \times 10^8$  virale Genome pro  $1 \times 10^6$  Zellen nachweisbar (Simon et al., 2006a). Dies entspricht - vorausgesetzt jede Zelle ist infiziert - einer Zahl von 100 Virusgenomen pro Zelle. Da während einer akuten Infektion aber nicht alle Zellen mit mCMV infiziert sind, liegt die tatsächliche Menge viraler Genome in einer Zelle noch einmal ungleich höher als die in dieser Arbeit nachgewiesene Menge von 7 bis 19 viralen Genomen pro Zelle

während latenter Infektion. Aus diesem Grunde waren auch in den hier diskutierten verschiedenen latent infizierten Zelltypen (LSEC, PECs, KMZ) keine maßgeblichen Unterschiede in der Zahl latenter viraler Genome zu erwarten.

## **Virale Transkripte in latent infizierter Leber und isolierten LSEC**

In der gesamten Leber latent infizierter Mäuse konnten mittels RT-qPCR direkt nach Organentnahme keine viralen IE1 und IE3 Transkripte detektiert werden. Dies bestätigt frühere Arbeiten, in denen auch keine viralen IE1 Transkripte nachgewiesen werden konnten (Koffron et al., 1998). Durch die Untersuchung von RNA aus isolierten LSEC latent infizierter Mäuse konnte erstmals der Beweis erbracht werden, dass in diesen angereicherten Zellen virale Transkripte der IE (IE1 und IE3) und sogar der E Phase (E1) zu finden sind. Während die Menge viraler IE1 Transkripte direkt nach Isolierung sehr niedrig war, IE3 Transkripte nur sporadisch vorkamen und E1 Transkripte gar nicht detektiert wurden, konnte durch eine 24stündige Kultivierung der LSEC eine Erhöhung viraler IE1 und IE3 sowie eine Induktion viraler E1 Transkripte nachgewiesen werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die virale IE und die nachgeschaltete E Genexpression durch Kultivierung der LSEC stimuliert werden kann. Für den fehlenden Nachweis viraler IE Transkripte in der gesamten Leber direkt nach Organentnahme ergeben sich daraus zwei mögliche Erklärungen. Einerseits besteht die Möglichkeit, dass die Menge viraler Transkripte in der gesamten Leber aufgrund der Vielzahl nicht infizierter Zellen (z.B. Hepatozyten) so gering ist, dass sie auch durch sensitivste Methoden wie die RT-qPCR nicht detektiert werden kann. Alternativ wäre denkbar, dass während der Viruslatenz in der Leber überhaupt keine viralen Transkripte exprimiert werden. In diesem Fall würde die Genexpression viraler Transkripte durch die Prozedur der Leberperfusion, des Kollagenaseverdaus der entnommenen Leber und der immunomagnetischen Aufreinigung induziert werden. Höchstwahrscheinlich entsteht nach der Leberperfusion und vor der Dissoziation der Leber eine durch fehlende Wiederdurchblutung bedingte Hypoxie im Lebergewebe, wodurch Entzündungsreaktionen ausgelöst werden können. In diesem Zusammenhang konnte in einer früheren Studie gezeigt werden, dass eine über 45 Minuten andauernde Ischämie und anschließende Wiederdurchblutung in der Niere von MIEPE-*lacZ* transgenen Mäusen die *enhancer* Domäne des hCMV MIEPE auch TNF-unabhängig aktivieren kann (Kim et al., 2005). Welche der beiden Möglichkeiten auf die latent infizierten LSEC zutrifft, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden, da für diese Untersuchungen eine möglichst hohe Sensitivität der Detektion viraler Transkripte mit einer möglichst kurzen Aufreinigungsdauer der LSEC kombiniert werden müsste, was bislang methodenbedingt nicht möglich ist.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, kann die Menge der IE und E Transkripte durch die Kultivierung der LSEC um 1 bis 2  $\log_{10}$  Stufen gesteigert, bzw. ihre Expression dadurch induziert werden. Durch den Einsatz der HDAC Inhibitoren VPA, TSA und SB wurde deshalb versucht, die virale Genexpression noch weiter zu verstärken, um in späteren Versuchen die Wahrscheinlichkeit einer Virusreaktivierung aus latent infizierten LSEC zu erhöhen. Diese Methode der Virusreaktivierung wurde bereits in einer früheren Arbeit beschrieben, in welcher aus latentem HSV-1 neuronaler Zellen durch den Einsatz der HDAC Inhibitoren TSA

und SB eine Reaktivierung induziert werden konnte (Danaher et al., 2005). In der hier vorliegenden Arbeit waren die RNA Ausbeuten aus den mit TSA, VPA und SB behandelten isolierten latent infizierten LSEC allerdings stark reduziert, was darauf schließen lässt, dass viele Zellen durch die Behandlung mit HDAC Inhibitoren nekrotisch oder apoptotisch wurden. Bislang existieren nur Studien für VPA, die belegen, dass Behandlungen mit dieser Substanz einen hepatotoxischen Effekt bewirken (Übersicht: Powell-Jackson et al., 1984). Die Induktion von Apoptose durch SB und TSA wurde bislang lediglich an Tumorzellen und nicht an Zellen der Leber nachgewiesen (Medina et al., 1997).

Die Quantifizierungen der RNA aus den behandelten LSEC ergaben, dass die Menge viraler IE1 und IE3 Transkripte in den mit SB, VPA und TSA behandelten Proben im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle stark vermindert war. E1 Transkripte, die in allen unbehandelten Kontrollen detektiert wurden, waren nur in jeweils einem von drei Ansätzen der SB und VPA Kulturen zu finden, in den mit TSA behandelten Kulturen wurde kein *e1* exprimiert. Im Gegensatz dazu konnte in früheren Studien an hCMV-infizierten Zellen gezeigt werden, dass Änderungen der Histonmodifikation latent infizierter Zellen beispielsweise durch TSA mit einer Reaktivierung aus der Latenz assoziiert sind (Meier, 2001; Reeves et al., 2005), was mit einer Erhöhung der Genexpression einhergehen muss. Eine Steigerung der Genexpression durch die Behandlung mit TSA konnte in dieser Arbeit lediglich in akut infizierten MEF gezeigt werden. Damit konnten die Ergebnisse von Tang & Maul (2003), dass die virale Proteinsynthese von IE1 und E1 in mit mCMV infizierten Zellen durch die Inkubation mit TSA verstärkt wird, bestätigt werden. Dabei ist die Menge der viralen Transkripte nicht von der eingesetzten TSA Dosis abhängig. Im Gegensatz zu einer anhaltenden Verstärkung der Genexpression kann TSA ebenfalls zeit- und dosisabhängig die Expression zellulärer Gene wie der endothelialen Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS) nach einer kurzzeitigen Induktion stark reduzieren (Gan et al., 2006). Da IE1 Transkripte aber sehr stabil sind (Simon et al., 2006a), hätte in den hier durchgeführten Versuchen eine ebenfalls nur kurzzeitige Erhöhung der IE1 Transkription durch die HDAC Inhibitoren auch nach 24 Stunden Inkubation der LSEC noch nachweisbar sein sollen.

Trotz einer Verstärkung der Genexpression in akut infizierten Zellen durch TSA belegen neueste Untersuchungen (Hummel et al., 2007), dass sich die Zahl der transkriptionellen Reaktivierungen von mCMV aus Milzexplantaten latent infizierter Mäuse, die mit TSA inkubiert wurden, nicht erhöht. Eine Induktion der transkriptionellen Reaktivierung konnte jedoch durch die Inkubation latent infizierter Milzexplantate mit TSA in Verbindung mit 5-Aza-2-Desoxycytidin erreicht werden (Hummel et al., 2007). Dieser Ansatz könnte in folgenden Versuchen auf die Leber übertragen werden, indem nicht die isolierten LSEC, sondern entweder die Leberexplantate aus latent infizierten Mäusen oder die Explantkulturen aus einem LSEC Transfer Versuch mit dem HDAC Inhibitor TSA und zusätzlich mit 5-Aza-2-Desoxycytidin inkubiert werden, um mögliche Unterschiede in der Anzahl der Reaktivierungsereignisse verfolgen zu können.

Mit dem HDAC Inhibitor SB konnten aus HSV-1 latent infizierten Zellen Reaktivierungen erreicht (Danaher et al., 2005) und die Permissivität von kultivierten Endothelzellen für hCMV gesteigert werden (Radsak et al., 1989). Ebenfalls stimuliert VPA die Replikation von hCMV in infizierten Endothelzellen (Kuntz-Simon & Obert, 1995; Michaelis et al., 2004). Diese durch SB und VPA Behandlung induzierten Effekte konnten weder in mit mCMV akut infizierten

MEF noch in latent infizierten LSEC bestätigt werden. Alle hier getesteten Ansätze ergaben keine Induktion bzw. Erhöhung der viralen Genexpression.

## Induktion der Reaktivierung aus latent infizierten LSEC

Durch Kultivierungen von zuvor immunomagnetisch isolierten LSEC aus latent infizierten Mäusen zusammen mit MEF kam es zu keiner Virusreaktivierung. Das Problem bei allen hier durchgeführten Versuchen liegt in der Lebensdauer isolierter LSEC in Kultur, die nur maximal 5 bis 6 Tage beträgt. Es existieren mehrere Studien, in denen durch Optimierung des Kulturmediums eine verlängerte Kultivierung bis zu 30 Tagen (Elvevold et al., 2005) erreicht werden konnte. So wurden beispielsweise serumhaltige Kulturmedien mit Phorbolster (De Zanger et al., 1997) oder *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Yamane et al., 1994) supplementiert oder serumfreie Medien (Krause et al., 2000; Elvevold et al., 2005) zur Verbesserung der Kulturbedingungen eingesetzt. Für alle Kokultivierungsexperimente, in denen LSEC zusammen mit MEF kultiviert werden, scheidet die Verwendung serumfreier Medien aus, da MEF unter Kulturbedingungen den Zusatz von Serum im Medium benötigen. Ein alternativer Ansatz zur Kokultivierung wäre demzufolge der Einsatz von VEGF oder Phorbolster zu den Kulturen.

Da in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte, dass LSEC transferierbar sind (Limmer et al., 2000; Benten et al., 2005), wurden LSEC aus latent infizierten Mäusen in immunsupprimierte Spender transferiert, um eine Reaktivierung zu induzieren. Mit der Immunsuppression, die durch Bestrahlung mit 6,5 Gy 24 Stunden vor Zelltransfer herbeigeführt wurde, kann die Ansiedelung der LSEC verbessert werden, da in allen getesteten Organen bestrahlter Tiere (Leber, Lunge und Milz) der Anteil der vom Spender abstammenden LSEC gegenüber den unbestrahlten Tieren erhöht war. Interessanterweise konnten 24 Stunden nach Transfer die meisten transferierten Zellen in der Lunge detektiert werden. Die organspezifische Anreicherung transferierter LSEC ist sehr stark vom Injektionsort abhängig, da beispielsweise intraportale Injektionen von LSEC direkt zu einer Anreicherung in der Leber führen (Benten et al., 2005), während nach i.v. Injektion die meisten transferierten Zellen in der Lunge nachweisbar sind. Da die Applikation der isolierten LSEC in dieser Arbeit stets i.v. erfolgte, wurden aus den LSEC Empfängertieren nicht nur die Leber, sondern auch die Lunge und die Milz entnommen, gestückelt und als Explantkultur auf Reaktivierung getestet.

In den getesteten Kulturen von Leber, Lunge und Milz konnte im ersten Versuch 5 Wochen nach Organentnahme bis zum Abbruch des Versuches nach 13 Wochen in 2 Kulturen der Lunge eine mCMV Reaktivierung und somit die Rekurrenz infektiöser Viren bestätigt werden. Dieses Ergebnis wurde durch einen zweiten Versuch verifiziert, in dem ebenfalls 5 Wochen nach Organentnahme in einer Lungenkultur eine mCMV Reaktivierung detektiert werden konnte. Die Rekurrenz infektiöser Viren konnte in diesem Versuch allerdings nur bis Woche 8 beobachtet werden, danach war die Kultur wieder negativ. Da die Organe 24 Stunden nach LSEC Transfer entnommen wurden und wie bereits erwähnt eine sehr große Zahl transferierter LSEC in der Lunge nachweisbar waren, ist eine Reaktivierung aus den Lungenexplantaten und nicht aus den Leber- oder Milzexplantaten wahrscheinlich. Für den sehr geringen Anteil der Reaktivierungsergebnisse innerhalb der gesamten Explantate (2

Reaktivierungsereignisse aus insgesamt 240 Ansätzen, entspricht knapp 1% positive Ansätze in Versuch 1 und ein Reaktivierungsereignis aus insgesamt 216 Ansätzen, entspricht ungefähr 0,5% positive Ansätze in Versuch 2) lassen sich mehrere Gründe anführen. Insgesamt wurden in den jeweiligen Versuchen  $2 \times 10^4$  Virusgenome in  $2 \times 10^7$  Zellen bzw.  $1,65 \times 10^4$  Virusgenome in  $1,5 \times 10^7$  Zellen transferiert, dies entspricht bei 11 Virusgenomen pro latent infizierter Zelle einer Menge von  $1,8 \times 10^3$  bzw.  $1,5 \times 10^3$  latent infizierten LSEC. Mit den aus dem LSEC Empfänger entnommenen Organen wurde sicherlich nur ein kleiner Teil der transferierten Zellen wieder gewonnen. Die restlichen LSEC, die sich eventuell noch im Blutgefäßsystem oder in anderen Organen wie beispielsweise den Nieren des Empfängers befanden, konnten nicht auf Reaktivierung geprüft werden. Die bereits diskutierten Reaktivierungsversuche mit Explantkulturen der gesamten Leber aus latent infizierten Mäusen ergaben einen Anteil positiver Ereignisse zwischen 4% und 20%. Diese großen Unterschiede in der Anzahl positiver Ereignisse müssen durch die oben genannten Bedingungen zustande kommen. Desweiteren werden aus der Leber latent infizierter Mäuse sicherlich nicht quantitativ alle LSEC isoliert, was bedeutet, dass schon bei der Aufreinigung der LSEC ein erheblicher Verlust an latent infizierten Zellen entsteht. Interessanterweise wurden aus den Kulturen der Lebern latent infizierter Mäuse schon nach 2 bis 2,5 Wochen die ersten Reaktivierungsereignisse detektiert, deren Anzahl sich nach 5 bis 7 Wochen Kultur noch leicht erhöhen konnte. Dies deutet darauf hin, dass der Zeitpunkt einzelner Reaktivierungsereignisse aus latent infizierten LSEC mit 2 bis 7 Wochen sehr heterogen ist. Durch das Ergebnis des zweiten Reaktivierungsversuchs konnte allerdings ausgeschlossen werden, dass diese Heterogenität auf einer Kontamination der LSEC Fraktion mit anderen latent infizierten Zellen beruht, da ein Transfer der MACS<sup>-</sup> Fraktion – also der gesamten restlichen nichtparenchymalen Zellen ohne die LSEC - in eine bestrahlte Empfängermaus mit anschließender Kultivierung der entnommenen und gestückelten Organe keine Reaktivierung induzierte.

In mehreren früheren Arbeiten wurde die Reaktivierung durch den Transfer von Zellen oder die Transplantation von Organen aus latent infizierten Tieren induziert. Mayo und Kollegen (1978) übertrugen Milzzellen aus latent infizierten Mäusen und bewiesen, dass latent infizierte Zellen effizienter bei syngenen als bei allogenen Transfers reaktivieren können. Dieser Effekt spielte in Transplantationsversuchen mit Nieren latent infizierter Mäuse keine Rolle, da sowohl bei syngenen als auch bei allogenen Transplantationen Reaktivierungen induziert werden konnten, die sich in ihrer Häufigkeit nicht signifikant unterschieden (Hamilton & Seaworth, 1985). In immunkompetenten Mäusen konnte durch die syngene Transplantation von Speicheldrüsen aus latent infizierten Mäusen nur in einem geringen Prozentsatz der Transplantationen eine Reaktivierung beobachtet werden, die erst nach vier Wochen auftrat (Schmader et al., 1995). Im Gegensatz zu entnommenen Organen ist es gerade für isolierte Zellfraktionen sehr schwierig, optimale Kulturbedingungen zu etablieren, unter denen die Zellen, entweder separat oder wieder in einen neuen Gewebeverband transferiert, die lange Zeitspanne bis zur Reaktivierung latenter viraler Genome unbeschadet überdauern können.

## Ausblick

Die Etablierung der immunomagnetischen Separation der Leber in einzelne zelluläre Fraktionen ermöglicht eine Übertragung des Ansatzes auf andere Organe latent infizierter Mäuse. Als Kandidat bietet sich hier vor allem die Lunge an, da in der Lunge die höchste virale DNA *Load* quantifiziert werden kann und somit die isolierten zellulären Fraktionen problemlos auf Präsenz viraler Genome untersucht werden können. Über die immunomagnetische Aufreinigung von Endothelzellen aus der Lunge existieren Protokolle (Dong et al., 1997; Marelli-Berg et al., 2000; Ewing et al., 2003), so dass die Übertragung der Fragestellung von der Leber auf die Lunge in Bezug auf die Isolierung von Endothelzellen zu bewerkstelligen sein sollte. Andere zelluläre Fraktionen wie beispielsweise Alveolarmakrophagen oder Pneumozyten sollten aufgrund der Expression ihrer Oberflächenrezeptoren oder ihrer spezifischen Größe ebenfalls immunomagnetisch oder mittels Dichtegradientenzentrifugation zu isolieren sein. Alle neu angewandten Methoden müssen sorgfältig etabliert werden, um eine größtmögliche Reinheit der isolierten Populationen zu garantieren. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen versprechen sehr interessant zu werden, da in der Leber die Endothelzellen als Träger latenter viraler Genome identifiziert wurden, für die Lunge aber Makrophagen als der latent infizierte Zelltyp postuliert werden (Koffron et al., 1998). Nach der Identifizierung des mCMV Latenzortes in der Lunge könnten analog zur Vorgehensweise in der Leber die Frequenzen latenter viraler Genome in den zellulären Fraktionen bestimmt werden, woran sich Transkriptanalysen und Untersuchungen zur Reaktivierung anschließen.

Zur Quantifizierung der viralen Genexpression während der mCMV Latenz kann die etablierte Duplex RT-qPCR für IE1 und IE3 noch erweitert werden. So können in einem Ansatz, neben den IE1 und IE3 Transkripten, im TaqMan noch zwei weitere Transkripte, wie beispielsweise IE2 und E1, in die Quantifizierung eingesetzt werden. Damit wäre es möglich, in einer Quantifizierung vier Transkripte zu untersuchen, wodurch eine Limitierung der Transkriptanalysen, die durch die geringen Elutionsvolumina der RNA Proben bedingt ist, umgangen werden kann. Ebenfalls ermöglicht die simultane Untersuchung der Expression von vier Genen den direkten Vergleich der Transkriptmengen in einer Probe. Bei diesen Untersuchungen muss jedoch die Voraussetzung erfüllt sein, dass alle *in vitro* Transkripte, die als externe Standards eingesetzt werden, auf die exakt gleiche Teilchenzahl eingestellt sind. Deshalb bietet es sich an, nur ein *in vitro* Transkript zu verwenden, das die benötigten Sequenzbereiche aller vier Gene enthält. Die Genexpressionsuntersuchungen sollten dabei nicht auf die drei Transkripte der IE und auf das eine Transkript der E Phase beschränkt bleiben, es sollten vielmehr weitere RT-qPCRs etabliert werden, um die Expression weiterer Gene während der mCMV Latenz, wie beispielsweise die der so genannten Immunevasionsgene m04, m06 und m152 (Übersicht: Reddehase, 2002) zu untersuchen.

## 5 Literaturverzeichnis

- Achachi, A., A. Florins, N. Gillet, C. Debacq, P. Urbain, G. M. Foutsop, F. Vandermeers, A. Jasik, M. Reichert, P. Kerkhofs, L. Lagneaux, A. Burny, R. Kettmann, and L. Willems.** 2005. Valproate activates bovine leukemia virus gene expression, triggers apoptosis, and induces leukemia/lymphoma regression *in vivo*. *PNAS* **102**: 10309-10314.
- Adam, E., J. L. Melnick, and J. L. Probstfield.** 1987. High levels of cytomegalovirus antibody in patients requiring vascular surgery for atherosclerosis. *Lancet* **2**: 291-293.
- Ades, C. J., G. A. Ablett, R. J. Collins, and I. H. Bunce.** 1989. Cell suspensions from Collagenase digestion of bone marrow trephine biopsy specimens. *J. Clin. Pathol.* **42**: 427-431.
- Agirati, C., F. Martini, C. Nisii, A. Oliva, G. D'Offizi, P. Narciso, R. Nardacci, M. Piacentini, F. Dieli, L. P. Puccillo, and F. Poccia.** 2005. CD1d expression by hepatocytes is a main restriction element for intrahepatic T-cell recognition. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **19**: 41-48.
- Alpini, G., J. O. Phillips, B. Vroman, and N. F. LaRusso.** 1994. Recent advances in the isolation of liver cells. *Hepatology* **20**: 494-514.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Andrews, D. M., C. E. Andoniou, F. Granucci, P. Ricciardi-Castagnoli, and M. A. Degli-Esposti.** 2001. Infection of dendritic cells by murine cytomegalovirus induces functional paralysis. *Nature Immunol.* **2**: 1077-1084.
- Angulo, A., P. Ghazal, and M. Messerle.** 2000. The major immediate-early gene *ie3* of mouse cytomegalovirus is essential for viral growth. *J. Virol.* **74**: 11129-11136.
- Apolinario, A., P. L. Majano, R. Lorente, O. Núñez, G. Clemente, and C. García-Monzón.** 2005. Gene expression profile of T-cell-specific chemokines in human hepatocyte-derived cells: evidence for a synergistic inducer effect of cytokines and hepatitis C virus proteins. *J. Viral Hepat.* **12**: 27-37.
- Arai, K., Z.-X. Liu, T. Lane, and G. Dennert.** 2002. IP-10 and Mig facilitate accumulation of T cells in the virus-infected liver. *Cell. Immunol.* **219**: 48-56.
- Arase, H., E. S. Mocarski, A. E. Campbell, A. B. Hill, and L. L. Lanier.** 2002. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* **296**: 1323-1326.
- Arnold, J. C., B. C. Portman, J. G. O'Grady, N. V. Naoumov, G. J. M. Alexander, and R. Williams.** 1992. Cytomegalovirus infection persists in the liver graft in the vanishing bile duct syndrome. *Hepatology* **16**: 285-292.
- Asahara, T., H. Masuda, T. Takahashi, C. Kalka, C. Pastore, M. Silver, M. Kearne, M. Magner, and J. M. Isner.** 1999. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ. Res.* **85**: 221-228.
- Asahara, T., T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzenbichler, G. Schatteman, and J. M. Isner.** 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**: 964-967.
- Augustin, H. G., D. H. Kozian, and R. C. Johnson.** 1994. Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays* **16**: 901-906.
- Ayalon, O., H. Sabanai, M.-G. Lampugnani, E. Dejana, and B. Geiger.** 1994. Spatial and temporal relationships between cadherins and PECAM-1 in cell-cell junctions of human endothelial cells. *J. Cell Biol.* **126**: 247-258.



- Baba, S., H. Fujii, T. Hirose, K. Yasuchika, H. Azuma, T. Hoppo, M. Naito, T. Machimoto, and I. Ikai.** 2004. Commitment of bone marrow cells to hepatic stellate cells in mouse. *J. Hepatol.* **40**: 255-260.
- Bachem, M. G., D. Meyer, D. Melchior, K. M. Sell, and A. M. Gressner.** 1992. Activation of rat liver perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblast-like cells: a potential mechanism of self perpetuation in liver fibrogenesis. *J. Clin. Invest.* **89**: 19-27.
- Bailey, A. S., S. Jiang, M. Afentoulis, C. I. Baumann, D. A. Schroeder, S. B. Olson, M. H. Wong, and W. H. Fleming.** 2004. Transplanted adult hematopoietic stems cells differentiate into functional endothelial cells. *Blood* **103**: 13-19.
- Bain, M., M. Reeves, and J. Sinclair.** 2006. Regulation of human cytomegalovirus gene expression by chromatin remodelling, p. 167-183. *In* M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Balthesen, M., M. Messerle, and M. J. Reddehase.** 1993. Lungs are a major organ site of cytomegalovirus latency and recurrence. *J. Virol.* **67**: 5360-5366.
- Balthesen, M., L. Dreher, P. Lucin, and M. J. Reddehase.** 1994a. The establishment of cytomegalovirus latency in organs is not linked to local virus production during primary infection. *J. Gen. Virol.* **75**: 2329-2336.
- Balthesen, M., M. Susa, P. Lucin, and M. J. Reddehase.** 1994b. Cytomegalovirus DNA detected in blood leukocytes after resolution of productive infection does not originate from latently infected hematopoietic stem cells in the bone marrow. *Croat. Med. J.* **35**: 19-25.
- Banchereau, J., and R. M. Steinman.** 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**: 245-252.
- Bancroft, G. J.** 1993. The role of natural killer cells in innate resistance to infection. *Curr. Opin. Immunol.* **5**: 503-510.
- Barberá-Guillem, E., M. Rocha, A. Alvarez, and F. Vidal-Vanaclocha.** 1991. Differences in the lectin-binding patterns of the periportal and perivenous endothelial domains in the liver sinusoids. *Hepatology* **14**: 131-139.
- Bauer, J.** 1999. Advances in cell separation: recent developments in counterflow centrifugal elutriation and continuous flow cell separation. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **722**: 55-69.
- Benten, D., A. Follenzi, K. K. Bhargava, V. Kumaran, C. J. Palestro, and S. Gupta.** 2005. Hepatic targeting of transplanted liver sinusoidal endothelial cells in intact mice. *Hepatology* **42**: 140-148.
- Bertolino, P., D. G. Bowen, G. W. McCaughan, B. Fazekas de St. Groth.** 2001. Antigen-specific primary activation of CD8<sup>+</sup> T cells within the liver. *J. Immunol.* **166**: 5430-5438.
- Bertolino, P., M. C. Trescol-Biemont, and C. Roubardin-Combe.** 1998. Hepatocytes induce functional activation of naïve CD8<sup>+</sup> T lymphocytes but fail to promote survival. *Eur. J. Immunol.* **28**: 221-236.
- Bertolino, P., M. C. Trescol-Biemont, J. Thomas, B. Fazekas de St. Groth, M. Pihlgren, J. Marvel, and C. Roubardin-Combe.** 1999. Death by neglect as a deletional mechanism of peripheral tolerance. *Int. Immunol.* **11**: 1225-1238.
- Beutler, E., T. Gelbart, and W. Kuhl.** 1990. Interference of heparin with the polymerase chain reaction. *Biotechniques* **9**: 166.
- Bevan, I. S., C. C. Sammons, and C. Sweet.** 1996. Investigation of murine cytomegalovirus latency and reactivation in mice using viral mutants and the polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.* **48**: 308-320.

- Birnboim, H. C., and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1522.
- Bissinger, A. L., H. Oettle, G. Jahn, P. Neuhaus, and C. Sinzger.** 2004. Cytomegalovirus infection after orthotopic liver transplantation is restricted by a pre-existing antiviral immune response of the recipient. *J. Med. Virol.* **73**: 45-53.
- Bissinger, A. L., C. Sinzger, E. Kaiserling, and G. Jahn.** 2002. Human cytomegalovirus as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease. *J. Med. Virol.* **67**: 200-206.
- Blomhoff, R., C. A. Drevon, W. Eskild, P. Helgerud, K. R. Norum, and T. Berg.** 1984. Clearance of acetyl low density lipoprotein by rat liver endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **259**: 8898-8903.
- Blouin, A., R. P. Bolender, and E. R. Weibel.** 1977. Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *J. Cell Biol.* **72**: 441-455.
- Boeckh, M., and R. Bowden.** 1995. Cytomegalovirus infection in marrow transplantation, p. 97-136. *In*: C. D. Bruckner (ed.), *Technical and biological components of marrow transplantation*. Boston: Kluwer Academic.
- Boehme, K. W., and T. Compton.** 2006. Virus entry and activation of innate immunity, p. 111-130. *In* M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Bolovan-Fritts, C. A., E. S. Mocarski, and J. A. Wiedeman.** 1999. Peripheral blood CD14<sup>+</sup> cells from healthy subjects carry a circular conformation of latent cytomegalovirus genome. *Blood* **93**: 394-398.
- Boom, R., C. J. A. Sol, T. Schuurman, A. van Breda, J. F. L. Weel, M. Beld, I. J. M. ten Berge, P. M. E. Wertheim-van Dillen, and M. D. de Jong.** 2002. Human cytomegalovirus DNA in plasma and serum specimens of renal transplant recipients is highly fragmented. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 4105-4113.
- Boppana, S. B., K. B. Fowler, Y. Vaid, G. Hedlund, S. Stagno, W. J. Britt, and R. F. Pass.** 1997. Neuroradiographic findings in the newborn period and long-term outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics* **99**: 409-414.
- Boppana, S. B., R. F. Pass, W. J. Britt, S. Stagno, and C. A. Alford.** 1992. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *Pediatr. Infect. Dis.* **11**: 93-99.
- Bowen, D. G., M. Zen, L. Holz, T. Davis, G. W. McCaughan, and P. Bertolino.** 2004. The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity. *J. Clin. Invest.* **114**: 701-712.
- Braet, F., and E. Wisse.** 2002. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp. Hepatol.* **1**: 1-17.
- Brautigam, A. R., F. J. Dutko, L. B. Olding, and M. B. A. Oldstone.** 1979. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection: the macrophage as a permissive cell for cytomegalovirus infection, replication and latency. *J. Gen. Virol.* **44**: 349-359.
- Brown, M. S., S. K. Basu, J. R. Falck, Y. K. Ho, and J. L. Goldstein.** 1980. The scavenger cell pathway for lipoprotein degradation: specificity of the binding site that mediates the uptake of negatively-charged LDL by macrophages. *J. Supramol. Struct.* **13**: 67-81.
- Brown, M. S., J. L. Goldstein, M. Krieger, Y. K. Ho, and R. G. W. Anderson.** 1979. Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins. *J. Cell Biol.* **82**: 597-613.

- Bruning, J. H., C. A. Bruggeman, C. P. van Boven, and P. J. van Breda Vriesman.** 1986. Passive transfer of cytomegalovirus by cardiac and renal organ transplants in a rat model. *Transplantation* **41**: 695-698.
- Bühler, B., G. M. Keil, F. Weiland, and U. H. Koszinowski.** 1990. Characterization of the murine cytomegalovirus early transcription unit e1 that is induced by immediate-early proteins. *J. Virol.* **64**: 1907-1919.
- Bukowski, J. F., B. A. Woda, and R. M. Welsh.** 1984. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice. *J. Virol.* **52**: 119-128.
- Burt, A. D.** 1999. Pathobiology of hepatic stellate cells. *J. Gastroenterol.* **34**: 299-304.
- Cardin, R. D., G. B. Abenes, C. A. Stoddart, and E. S. Mocarski.** 1995. Murine cytomegalovirus IE2, an activator of gene expression, is dispensable for growth and latency in mice. *Virology* **209**: 236-241.
- Cardier, J. E., and E. Barberá-Guillem.** 1997. Extramedullary hematopoiesis in the adult mouse liver is associated with specific hepatic sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* **26**: 165-175.
- Carreira, C. M., S. M. Nasser, E. di Tomaso, T. P. Padera, Y. Boucher, S. I. Tomarev, and R. K. Jain.** 2001. LYVE-1 is not restricted to the lymph vessels: expression in normal liver blood sinusoids and down-regulation in human liver cancer and cirrhosis. *Cancer Res.* **61**: 8079-8084.
- Calne, R. Y., R. A. Sells, J. R. Pena, D. R. Davis, P. R. Millard, B. M. Herbertson, R. M. Rinns, and D. A. Davies.** 1969. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* **223**: 472-476.
- Cantor, H. M., and A. E. Dumont.** 1967. Hepatic suppression of sensitization to antigen absorbed into the portal system. *Nature* **215**: 744-745.
- Cha, T., E. Tom, G. W. Kemble, G. M. Duke, E. S. Mocarski, and R. R. Spaete.** 1996. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J. Virol.* **70**: 78-83.
- Chang, Y., E. Cesarman, M. S. Pessin, F. Lee, J. Culpepper, D. M. Knowles, and P. S. Moore.** 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* **266**: 1865-1869.
- Chee, M. S., A. T. Bankier, S. Beck, R. Bohni, C. M. Brown, R. Cerny, T. Horsnell, C. A. Hutchison III, T. Kouzarides, J. A. Martignetti, E. Preddie, S. C. Satchwell, P. Tomlinson, K. M. Westom, and B. G. Barrell.** 1990a. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **154**: 125-169.
- Chee, M. S., S. C. Satchwell, E. Preddie, K. M. Weston, and B. G. Barrell.** 1990b. Human cytomegalovirus encodes three G protein-coupled receptor homologues. *Nature* **344**: 774-777.
- Chen, D. H., H. Jiang, M. Lee, F. Liu, and Z. H. Zhou.** 1999. Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus. *Virology* **260**: 10-16.
- Chen, M., P. Tabaczewski, S. M. Truscott, L. van Kaer, and I. Stroynowski.** 2005. Hepatocytes express abundant surface class I MHC and efficiently use transporter associated with antigen processing, tapasin, and low molecular weight polypeptide proteasome subunit components of antigen processing and presentation pathway. *J. Immunol.* **175**: 1047-1055.
- Chong, K. T., and C. A. Mims.** 1981. Murine cytomegalovirus particle types in relation to sources of virus and pathogenicity. *J. Gen. Virol.* **57**: 415-419.
- Cines, D. B., E. S. Pollak, C. A. Buck, J. Loscalzo, G. A. Zimmerman, R. P. McEver, J. S. Pober, T. M. Wick, B. A. Konkle, B. S. Schwartz, E. S. Barnathan, K. R. McCrae, B. A. Hug, A.-M. Schmidt, and D. M. Stern.** 1998. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* **91**: 3527-3561.

- Ciocco-Schmitt, G. M., Z. Karabekian, E. W. Godfrey, R. M. Stenberg, A. E. Campell, and J. A. Kerry.** 2002. Identification and characterization of novel murine cytomegalovirus M112-113 (e1) gene products. *Virology* **294**: 199-208.
- Cohen, S. N., A. C. Y. Chang, and L. Hsu.** 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69**: 2110-2114.
- Collins, T., C. Pomeroy, and M. C. Jordan.** 1993. Detection of latent cytomegalovirus DNA in diverse organs of mice. *J. Infect. Dis.* **168**: 725-729.
- Compton, T., R. R. Nepomuceno, and D. M. Nowlin.** 1992. Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface. *Virology* **191**: 387-395.
- Compton, T., D. M. Nowlin, and N. R. Cooper.** 1993. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* **193**: 834-841.
- Crispe, I. N.** 2003. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **3**: 51-62.
- Crispe, I. N., T. Dao, K. Klugewitz, W. Z. Mehal, and D. P. Metz.** 2000. The liver as a site of T-cell apoptosis: graveyard, or killing field? *Immunol. Rev.* **174**: 47-62.
- Crockett, A. O., and C. T. Wittwer.** 2001. Fluorescein-labeled oligonucleotides for real-time PCR: using the inherent quenching of deoxyguanosine nucleotides. *Anal. Biochem.* **290**: 89-97.
- Curbishley, S. M., B. Eksteen, R. P. Gladue, P. Lalor, and D. H. Adams.** 2005. CXCR3 activation promotes lymphocyte transendothelial migration across human hepatic endothelium under fluid flow. *Am. J. Pathol.* **167**: 887-899.
- Dalod, M., T. Hamilton, R. Salomon, T. P. Salazar-Mather, S. C. Henry, J. D. Hamilton, and C. A. Biron.** 2003. Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon  $\alpha/\beta$ . *J. Exp. Med.* **197**: 885-898.
- Danaher, R. J., R. J. Jacob, M. R. Steiner, W. R. Allen, J. M. Hill, and C. S. Miller.** 2005. Histone deacetylase inhibitors induce reactivation of herpes simplex virus type 1 in a latency-associated transcript-independent manner in neuronal cells. *J. Neurovirol.* **11**: 306-317.
- Daoust, R., and A. Cantero.** 1959. The numerical proportions of cell types in rat liver during carcinogenesis by 4-dimethylaminoazobenzene (DAB). *Cancer Res.* **19**: 757-762.
- Davison, A. J., A. Dolan, P. Akter, C. Addison, D. J. Dargan, D. J. Alcendor, D. J. McGeoch, and G. S. Hayward.** 2003. The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J. Gen. Virol.* **84**: 17-28.
- Decker, K.** 1990. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur. J. Biochem.* **192**: 245-261.
- DeLeve, L. D., X. Wang, L. Hu, M. K. McCuskey, and R. S. McCuskey.** 2004. Rat liver sinusoidal endothelial cell phenotype is maintained by paracrine and autocrine regulation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **287**: G757-G763.
- DeLeve, L. D., X. Wang, M. K. McCuskey, and R. S. McCuskey.** 2006. Rat liver endothelial cells isolated by anti-CD31 immunomagnetic separation lack fenestrae and sieve plates. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **291**: G1187-G1190.
- Demetris, A. J., S. G. Qian, H. Sun, and J. J. Fung.** 1990. Liver allograft rejection: an overview of morphological findings. *Am. J. Surg. Pathol.* **14**: 49-63.
- Denker, B. M., and S. K. Nigam.** 1998. Molecular structure and assembly of the tight junction. *Am. J. Physiol.* **274**: F1-9.
- Detich, N., V. Bovenzi, and M. Szyf.** 2003. Valproate induces replication-independent active DNA demethylation. *J. Biol. Chem.* **278**: 27586-27592.

- DeWire, S. M., and B. Damania.** 2005. The latency-associated nuclear antigen of rhesus monkey rhadinovirus inhibits viral replication through repression of Orf50/Rta transcriptional activation. *J. Virol.* **79**: 3127-3138.
- De Zanger, R., F. Braet, M. R. Arnez Camacho, and E. Wisse.** 1997. Prolongation of hepatic endothelial cell cultures by phorbol myristate acetate. In: Wisse, E., D. L. Knook, C. Balabaud (eds.), *Cells of the hepatic sinusoid*. Leiden: The Kupffer cell foundation, The Netherlands, 6. p.97-101.
- Digel, M., and C. Sinzger.** 2006. Determinants of endothelial cell tropism of human cytomegalovirus, p. 445-464. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Dini, L., and E. C. Carlà.** 1998. Hepatic sinusoidal endothelium heterogeneity with respect to the recognition of apoptotic cells. *Exp. Cell Res.* **240**: 388-393.
- Dini, L., P. Pagliara, and E. C. Carlà.** 2002. Phagocytosis of apoptotic cells by liver: a morphological study. *Microsc. Res. Tech.* **57**: 530-540.
- Do, H., J. F. Healey, E. K. Waller, and P. Lollar.** 1999. Expression of factor VIII by murine liver sinusoidal endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **274**: 19587-19592.
- Dolan, A., C. Cunningham, R. D. Hectors, A. F. Hassan-Walker, L. Lee, C. Addison, D. J. Dargan, D. J. McGeoch, D. Gatherer, V. C. Emery, P. D. Griffiths, C. Sinzger, B. P. McSharry, G. W. G. Wilkinson, and A. J. Davison.** 2004. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* **85**: 1301-1312.
- Dong, Q. G., S. Bernasconi, S. Lostaglio, R. W. De Calmanovici, I. Martin-Padura, F. Breviario, C. Garlanda, S. Ramponi, A. Mantovani, and A. Vecchi.** 1997. A general strategy for isolation of endothelial cells from murine tissue. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**: 1599-1604.
- Dumas, A. M., J. L. Geelen, W. Maris, and J. Van der Noorda.** 1980. Infectivity and molecular weight of varicella-zoster virus DNA. *J. Gen. Virol.* **47**: 233-235.
- Dunn, W., C. Chou, H. Li, R. Hai, D. Patterson, V. Stolc, H. Zhu, and F. Liu.** 2003. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 14224-14228.
- Eickbush, T. H., and E. N. Moudrianakis.** 1978. The compaction of DNA-helices into either continuous supercoils or folded fiber rods and toroids. *Cell* **13**: 295-306.
- Eickmann, M., D. Gicklhorn, and K. Radsak.** 2006. Glycoprotein trafficking in virion morphogenesis, p. 245-264. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Elvevold, K., G. I. Nedredal, A. Revhaug, K. Bertheussen, and B. Smedsrød.** 2005. Long-term preservation of high endocytic activity in primary cultures of pig liver sinusoidal endothelial cells. *Eur. J. Cell Biol.* **84**: 749-764.
- Emery, V. C.** 2001. Investigation of CMV disease in immunocompromised patients. *J. Clin. Pathol.* **54**: 84-88.
- Epstein, M., W. Henle, B. Achoing, and Y. Barr.** 1965. Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *J. Exp. Med.* **121**: 761-770.
- Evans, P. C., N. Coleman, T. G. Wreghitt, D. G. D. Wight, and G. J. M. Alexander.** 1999. Cytomegalovirus infection of bile duct epithelial cells, hepatic artery and portal venous endothelium in relation to chronic rejection of liver grafts. *J. Hepatol.* **31**: 913-920.
- Ewing, P., A. Wilke, G. Brockhoff, R. Andresen, G. Eissner, E. Holler, and A. Gerbitz.** 2003. Isolation and transplantation of allogeneic pulmonary endothelium derived from GFP transgenic mice. *J. Immunol. Methods* **283**: 307-315.

- Falasca, L., A. Bergamini, A. Serafino, C. Balabaud, and L. Dini.** 1996. Human Kupffer cell recognition and phagocytosis of apoptotic peripheral blood lymphocytes. *Exp. Cell Res.* **224**: 152-162.
- Fazekas de St. Groth, S.** 1982. The evaluation of limiting dilution assays. *J. Immunol. Methods* **49**: R11-R23.
- Feire, A. L., H. Koss, and T. Compton.** 2004. Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 15470-15475.
- Fish, K. N., C. Soderberg-Naucler, L. K. Mills, S. Stenglein, and J. A. Nelson.** 1998. Human cytomegalovirus persistently infects aortic endothelial cells. *J. Virol.* **72**: 5661-5668.
- Ford, T., J. Graham, and D. Rickwood.** 1994. Iodixanol: a nonionic iso-osmotic centrifugation medium for the formation of self-generated gradients. *Anal. Biochem.* **220**: 360-366.
- Fortunato, E. A., and D. H. Spector.** 1999. Regulation of human cytomegalovirus gene expression. *Adv. Virus Res.* **54**: 61-128.
- Freese, D. K., D. C. Snover, H. L. Sharp, C. R. Gross, S. K. Savvik, and W. D. Payne.** 1991. Chronic rejection after liver transplantation: a study of clinical, histopathological and immunological features. *Hepatology* **13**: 882-891.
- Frenkel, N., E. C. Schirmer, L. S. Wyatt, G. Katsafanas, E. Roffmann, R. M. Danovich, and C. H. June.** 1990. Isolation of a new herpesvirus from human CD4<sup>+</sup> T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 748-752.
- Frevert, U., S. Engelmann, S. Zougbedé, J. Stange, B. Ng, K. Matuschewski, L. Liebes, and H. Yee.** 2005. Intravital observation of *plasmodium berghei* sporozoite infection of the liver. *PLoS Biol.* **3**: 1034-1046.
- Friedman, S. L.** 2000. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J. Biol. Chem.* **275**: 2247-2250.
- Friedman, A. S. L., and J. P. Arthur.** 2002. Reversing hepatic fibrosis. *Sci. Med.* **8**: 194-205.
- Friedman, S. L., S. Wei, and W. S. Blaner.** 1993. Retinol release by activated rat hepatic lipocytes: regulation by Kupffer cell-conditioned medium and PDGF. *Am. J. Physiol.* **264**: G947-G952.
- Fujii, H., T. Hirose, S. Oe, K. Yasuchika, H. Azuma, T. Fujikawa, M. Nagao, and Y. Yamaoka.** 2002. Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J. Hepatol.* **36**: 653-659.
- Gale, R. P., R. S. Sparkes, and D. W. Golde.** 1978. Bone marrow origin of hepatic macrophages (Kupffer cells) in humans. *Science* **201**: 937-938.
- Gan, Y., Y. H. Shen, B. Utama, J. Wang, J. Coselli, and X. L. Wang.** 2006. Dual effects of histone deacetylase inhibition by Trichostatin A on endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**: 29-34.
- Gao, Z. V., C. McAlister, G. M. Williams.** 2001. Repopulation of liver endothelium by bone-marrow-derived cells. *Lancet* **357**: 932-933.
- Gao, L. H., and S. S. Zheng.** 2004. Cytomegalovirus and chronic allograft rejection in liver transplantation. *World J. Gastroenterol.* **10**: 1857-1861.
- Ghazal, P., A. E. Visser, M. Gustems, R. García, E. M. Borst, K. Sullivan, M. Messerle, and A. Angulo.** 2005. Elimination of ie1 significantly attenuates murine cytomegalovirus virulence but does not alter replicative capacity in cell culture. *J. Virol.* **79**: 7182-7194.

- Giugni, T. D., C. Soderberg, D. J. Ham, R. M. Bautista, K. O. Hedlund, E. Moller, and J. A. Zaia.** 1996. Neutralization of human cytomegalovirus by human CD13-specific antibodies. *J. Infect. Dis.* **173**: 1062-1071.
- Glick, D., D. von Redlich, E. T. Juhas, and C. R. McEwen.** 1971. Separation of mast cells by centrifugal elutriation. *Exp. Cell Res.* **65**: 23-26.
- Göttlicher, M., S. Minucci, P. Zhu, O. H. Krämer, A. Schimpf, S. Giavara, J. P. Sleeman, F. L. Coco, C. Nervi, P. G. Pelicci, and T. Heinzel.** 2001. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* **20**: 6969-6978.
- Goodell, M. A., K. Brose, G. Paradis, A. S. Conner, and R. C. Mulligan.** 1996. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J. Exp. Med.* **183**: 1797-1806.
- Goodrich, J. M., M. Boeckh, and R. Bowden.** 1994. Strategies for the prevention of cytomegalovirus disease after marrow transplantation. *Clin. Infect. Dis.* **19**: 287-298.
- Graham, J., T. Ford, and D. Rickwood.** 1994. The preparation of subcellular organelles from mouse liver in self-generated gradients of iodixanol. *Anal. Biochem.* **220**: 367-373.
- Grant, P. A.** 2001. A tale of histone modifications. *Genome Biol.* **2**: 1-6.
- Grefte, A., N. Blom, M. van der Giessen, W. van Son, and T. H. The.** 1993a. Ultrastructural analysis of circulating cytomegalic cells in patients with active cytomegalovirus infection: evidence for virus production and endothelial origin. *J. Infect. Dis.* **168**: 1110-1118.
- Grefte, A., M. C. Harmsen, M. van der Giessen, S. Knollema, W. J. van Son, and T. H. The.** 1994. Presence of human cytomegalovirus (HCMV) immediate-early mRNA but not ppUL83 (lower matrix protein pp65) mRNA in polymorphonuclear and mononuclear leukocytes during active HCMV infection. *J. Gen. Virol.* **75**: 1989-1998.
- Grefte, A., M. van der Giessen, W. van Son, and T. H. The.** 1993b. Circulating cytomegalovirus (CMV) infected endothelial cells in patients with an active CMV infection. *J. Infect. Dis.* **167**: 270-277.
- Gregory, S. H., L. K. Barczynski, and E. J. Wing.** 1991. Effector function of hepatocytes and Kupffer cells in the resolution of systemic bacterial infections. *J. Leukoc. Biol.* **51**: 421-424.
- Grzimek, N. K. A., D. Dreis, S. Schmalz, and M. J. Reddehase.** 2001. Random, asynchronous, and asymmetric transcriptional activity of enhancer-flanking major immediate-early genes *ie1/3* and *ie2* during murine cytomegalovirus latency in the lungs. *J. Virol.* **75**: 2692-2705.
- Gruter, W.** 1924. Das Herpesvirus, seine aetiologische und klinische Bedeutung. *Münch. Med. Wochenschr.* **71**: 1058-1060.
- Gubbay, J., J. Collignon, P. Koopman, B. Capel, A. Economou, A. Münsterberg, N. Vivian, P. Goodfellow, and R. Lovell-Badge.** 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* **346**: 245-250.
- Guetta, E., V. Guetta, T. Shibusani, and S. E. Epstein.** 1997. Monocytes harbouring cytomegalovirus: interactions with endothelial cells, smooth muscle cells, and oxidized low-density lipoprotein. Possible mechanism for activating virus delivered by monocytes to sites of vascular injury. *Circ. Res.* **81**: 8-16.
- Hahn, G., R. Jores, and E. S. Mocarski.** 1998. Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 3937-3942.
- Hamilton, J. D., and B. J. Seaworth.** 1985. Transmission of latent cytomegalovirus in a murine kidney tissue transplantation model. *Transplantation* **39**: 290-296.

- Hanshaw, J. B., and J. A. Dudgeon.** 1978. Congenital cytomegalovirus, p. 97-152. *In*: A. J. Schaffner & M. Markowitz (eds.), *Viral diseases in the fetus and newborn*. Saunders, Philadelphia.
- Harder, R., H. Uhlig, A. Kashan, B. Schütt, A. Duijvestijn, E. C. Butcher, H.-G. Thiele, and A. Hamann.** 1991. Dissection of murine lymphocyte-endothelial cell interaction mechanisms by SV-40-transformed mouse endothelial cells: novel mechanisms mediating basal binding, and  $\alpha_4$ -integrin-dependent cytokine-induced adhesion. *Exp. Cell Res.* **197**: 259-267.
- Hardonk, M. J., H. van Goor, G. L. Scherphof, and T. Daemen.** 1989. Functional heterogeneities between large and small Kupffer cells, p. 434-439. *In*: E. Wisse, D. L. Knook, and Decker (eds.), *Cells of the hepatic sinusoid*, Vol. 2. The Kupffer cell foundation, Rijswijk, The Netherlands.
- Haynes, J. L.** 1988. Principles of flow cytometry. *Cytometry Suppl.* **3**: 7-17.
- Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak, and P. M. Williams.** 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **6**: 986-994.
- Hendrix, R. M. G., E. Beuken, R. L. Slobbe, and C. A. Bruggeman.** 1996. Detection and sequence analysis of the major immediate early and pp150 gene of latent human cytomegalovirus in spleen, liver, and kidney tissue of trauma victims. *J. Med. Virol.* **50**: 193-197.
- Hendrix, M. G., M. Daemen, and C. A. Bruggeman.** 1991. Cytomegalovirus nucleic acid distribution within the human vascular tree. *Am. J. Pathol.* **138**: 563-567.
- Hendrix, M. G., M. M. Salimans, C. P. van Boven, and C. A. Bruggeman.** 1990. High prevalence of latently present cytomegalovirus in arterial walls of patients suffering from grade III atherosclerosis. *Am. J. Pathol.* **136**: 23-28.
- Hendrix, R. M. G., M. Wagenaar, R. L. Slobbe, and C. A. Bruggeman.** 1997. Widespread presence of cytomegalovirus DNA in tissues of healthy trauma victims. *J. Clin. Pathol.* **50**: 59-63.
- Henry, S. C., and J. D. Hamilton.** 1993. Detection of murine cytomegalovirus immediate early 1 transcripts in the spleens of latently infected mice. *J. Infect. Dis.* **167**: 950-954.
- Henry, S. C., K. Schmader, T. T. Brown, S. E. Miller, D. N. Howell, G. G. Daley, and J. D. Hamilton.** 2000. Enhanced green fluorescent protein as a marker for localising murine cytomegalovirus in acute and latent infection. *J. Virol. Meth.* **89**: 61-73.
- Henson, D., R. D. Smith, and J. Gehrke.** 1966. Non-fatal mouse cytomegalovirus hepatitis. Combined morphologic, virologic and immunologic observations. *Am. J. Pathol.* **49**: 871-888.
- Hokeness, K. L., E. S. Deweerd, M. W. Munks, C. A. Lewis, R. P. Gladue, and T. P. Salazar-Mather.** 2007. CXCR-3 dependent recruitment of antigen-specific T lymphocytes to the liver during murine cytomegalovirus infection. *J. Virol.* **81**: 1241-1250.
- Holland, P. M., R. D. Abramson, R. Watson, and D. H. Gelfand.** 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'  $\rightarrow$  3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 7276-7280.
- Holtappels, R., M. W. Munks, J. Podlech, and M. J. Reddehase.** 2006. CD8 T-cell-based immunotherapy of cytomegalovirus disease in the mouse model of the immunocompromised bone marrow transplantation recipient, p. 383-418. *In* M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Holtappels, R., M. F. Pahl-Seibert, D. Thomas, and M. J. Reddehase.** 2000. Enrichment of immediate-early 1 (m123/pp89) peptide-specific CD8 T cells in a pulmonary CD62L<sup>lo</sup> memory-effector cell pool during latent murine cytomegalovirus infection of the lungs. *J. Virol.* **74**: 11495-11503.
- Holtappels, R., J. Podlech, G. Geginat, H. P. Steffens, D. Thomas, and M. J. Reddehase.** 1998. Control of murine cytomegalovirus in the lungs: relative but not absolute immunodominance of the



- immediate-early 1 nonapeptide during the antiviral cytolytic T-lymphocyte response in pulmonary infiltrates. *J. Virol.* **72**: 7201-7012.
- Holtappels, R., D. Thomas, J. Podlech, and M. J. Reddehase.** 2002. Two antigenic peptides from genes *m123* and *m164* of murine cytomegalovirus quantitatively dominate CD8 T-cell memory in the H-2<sup>d</sup> haplotype. *J. Virol.* **76**: 151-164.
- Honda, J., and K. Oizumi.** 2001. Quantitative Analysis of CMV in infected mice on the LightCycler system, p. 349-357. *In* S. Meuer, C. Wittwer, K.-I. Nakagawara (eds.), *Rapid Cycle Real-Time PCR: methods and applications*. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Huang, L., G. Soldevila, M. Leeker, R. Flavell, and I. N. Crispe.** 1994. The liver eliminates T cells undergoing antigen-triggered apoptosis in vivo. *Immunity* **1**: 741-749.
- Hume, D. A.** 1985. Immunohistochemical analysis of murine mononuclear phagocytes that express class II major histocompatibility antigens. *Immunobiology* **170**: 381-389.
- Hummel, M. and M. M. Abecassis.** 2002. A model for reactivation of CMV from latency. *J. Clin. Virol.* **25**: S123-S136.
- Hummel, M., S. Yan, Z. Li, T. K. Varghese, and M. Abecassis.** 2007. Transcriptional reactivation of murine cytomegalovirus *ie* gene expression by 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A in latently infected cells despite lack of methylation of the major immediate-early promoter. *J. Gen. Virol.* **88**: 1097-1102.
- Hummel, M., Z. Zhang, S. Yan, I. Deplaen, P. Golia, T. Varghese, G. Thomas, and M. I. Abecassis.** 2001. Allogeneic transplantation induces expression of cytomegalovirus immediate-early genes in vivo: a model for reactivation from latency. *J. Virol.* **75**: 4814-4822.
- Irmiere, A., and W. Gibson.** 1983. Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology* **130**: 118-133.
- Isaacson, M. K., A. L. Feire, and T. Compton.** 2007. Epidermal growth factor is not required for human cytomegalovirus entry or signaling. *J. Virol.* **81**: 6241-6247.
- Ito, T., and M. Nemoto.** 1952. Über die Kupfferschen Sternzellen und die Fettspeicherungszellen (fat-storing cells) in der Blutkapillarwand der menschlichen Leber. *Okajimas Folia Anat. Jpn.* **24**: 243-258.
- Izraeli, S., C. Pfeleiderer, and T. Lion.** 1991. Detection of gene expression by PCR amplification of RNA derived from frozen heparinized whole blood. *Nucl. Acids Res.* **19**: 6051.
- Jarvis, M. A., and J. A. Nelson.** 2002. Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 403-407.
- Jarvis, M. A., and J. A. Nelson.** 2007. Human cytomegalovirus tropism for endothelial cells: not all endothelial cells are created equal. *J. Virol.* **81**: 2095-2101.
- Jomantaité, I., N. Dikopoulos, A. Kröger, F. Leithäuser, H. Hauser, R. Schirmbeck, and J. Reimann.** 2004. Hepatic dendritic cell subsets in the mouse. *Eur. J. Immunol.* **34**: 355-365.
- Jonjic, S., I. Bubic, and A. Krmpotic.** 2006. Innate immunity to cytomegaloviruses, p. 285-319. *In* M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Jordan, M. C.** 1983. Latent infection and the elusive cytomegalovirus. *Rev. Infect. Dis.* **5**: 205-215.
- Jordan, M. C., and V. L. Mar.** 1982. Spontaneous activation of latent cytomegalovirus from murine spleen explants. *J. Clin. Invest.* **70**: 762-768.
- Jordan, M. C., J. D. Shanley, and J. G. Stevens.** 1977. Immunosuppression reactivates and disseminates latent murine cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* **37**: 419-423.

- Kageyama, S., S. Matsui, T. Hasegawa, Y. Yoshida, H. Sato, J. Yamamura, M. Kurokawa, H. Yamamoto, and K. Shiraki.** 1997. Augmentation of natural killer cell activity induced by cytomegalovirus infection in mice treated with FK506. *Acta Virol.* **41**: 215-220.
- Kamada, N., H. S. Davies, and N. Roser.** 1981. Reversal of transplantation immunity by liver grafting. *Nature* **292**: 840-842.
- Kaneda, K., and K. Wake.** 1983. Distribution and morphological characteristics of the pit cells in the liver of the rat. *Cell Tiss. Res.* **233**: 485-505.
- Katz, S. C., V. G. Pillarisetty, J. I. Bleier, A. B. Shah, and R. P. DeMatteo.** 2004. Liver sinusoidal endothelial cells are insufficient to activate T cells. *J. Immunol.* **173**: 230-235.
- Keil, G. M., A. Ebeling-Keil, and U. H. Koszinowski.** 1984. Temporal regulation of murine cytomegalovirus transcription and mapping of viral RNA synthesized at immediate early times after infection. *J. Virol.* **50**: 784-795.
- Keil, G. M., A. Ebeling-Keil, and U. H. Koszinowski.** 1987. Immediate-early genes of murine cytomegalovirus: location, transcripts, and translation products. *J. Virol.* **61**: 526-533.
- Kempka, G., and V. Kolb-Bachofen.** 1988. Binding, uptake, and transcytosis of ligands for mannose-specific receptors in rat liver: an electron microscopic study. *Exp. Cell Res.* **176**: 38-48.
- Khandoga, A., M. Hanschen, J. S. Kessler, and F. Krombach.** 2006. CD4<sup>+</sup> T cells contribute to postischemic liver injury in mice by interacting with sinusoidal endothelium and platelets. *Hepatology* **43**: 306-315.
- Kim, S. J., T. K. Varghese, Z. Zhang, L. C. Zhao, G. Thomas, M. Hummel, and M. Abecassis.** 2005. Renal ischemia/reperfusion injury activates the enhancer domain of the human cytomegalovirus major immediate early promoter. *Am. J. Transplant.* **5**: 1606-1613.
- Kishiye, T., K. Kaneda, H. Yamamoto, and K. Wake.** 1993. Cinematographic analysis of in vitro movements of liver-associated large granular lymphocytes of the rat. *Biomed. Res.* **14**: 81-92.
- Klemola, E., R. von Essen, G. Henle, and W. Henle.** 1970. Infectious mononucleosis-like disease with negative heterophil agglutination test. Clinical features in relation to Epstein-Barr virus and cytomegalovirus antibodies. *J. Infect. Dis.* **121**: 608-614.
- Klotman, M. E., S. C. Henry, R. C. Greene, P. C. Brazy, P. E. Klotman, and J. D. Hamilton.** 1990. Detection of mouse cytomegalovirus nucleic acid in latently infected mice by in vitro enzymatic amplification. *J. Infect. Dis.* **161**: 220-225.
- Klugewitz, K., F. Blumenthal-Barby, A. Schrage, P. A. Knolle, A. Hamann, and I. N. Crispe.** 2002. Immunomodulatory effects of the liver: deletion of activated CD4<sup>+</sup> effector cells and suppression of IFN- $\gamma$ -producing cells after intravenous protein immunization. *J. Immunol.* **169**: 2407-2413.
- Knolle, P. A., G. Gerken, E. Löser, H.-P. Dienes, F. Gantner, G. Tiegs, K.-H. Meyer zum Büschenfelde, and A. W. Lohse.** 1996. Role of sinusoidal endothelial cells of the liver in concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *Hepatology* **24**: 824-829.
- Knolle, P. A., and G. Gerken.** 2000. Local control of the immune response in the liver. *Immunol. Rev.* **174**: 21-34.
- Knolle, P. A., and A. Limmer.** 2003a. Control of immune responses by scavenger liver endothelial cells. *Swiss Med. Wkly.* **133**: 501-506.
- Knolle, P. A., and A. Limmer.** 2003b. Role and function of liver sinusoidal endothelial cells, p. 59-72. *In*: M. E. Gershwin, J. M. Vierling, and M. P. Manns (eds.), *Liver immunology*, Philadelphia, PA, Hanley & Belfus, Inc.
- Knolle, P. A., E. Schmitt, S. Jin, T. Germann, R. Duchmann, S. Hegenbarth, G. Gerken, and A. W. Lohse.** 1999. Induction of cytokine production in naive CD4<sup>+</sup> T cells by antigen-presenting

- murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward T<sub>H1</sub> cells. *Gastroenterology* **116**: 1428-1440.
- Knook, D. L., and E. C. Sleyster.** 1976. Separation of Kupffer and endothelial cells of the rat liver by centrifugal elutriation. *Exp. Cell. Res.* **99**: 444-449.
- Koffron, A. J., M. Hummel, B. K. Patterson, S. Yan, D. B. Kaufman, J. P. Fryer, F. P. Stuart, and M. I. Abecassis.** 1998. Cellular localization of latent murine cytomegalovirus. *J. Virol.* **72**: 95-103.
- Koffron, A. J., K. H. Mueller, D. B. Kaufman, F. P. Stuart, B. Patterson, and M. I. Abecassis.** 1995. Direct evidence using in situ polymerase chain reaction that the endothelial cell and T-lymphocyte harbor latent murine cytomegalovirus. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* **99**: 61-62.
- Koffron, A. J., B. K. Patterson, S. Yan, D. B. Kaufman, J. P. Fryer, F. P. Stuart, and M. I. Abecassis.** 1997. Latent human cytomegalovirus: a functional study. *Transplant. Proc.* **29**: 793-795.
- Kondo, K., H. Kaneshima, and E. S. Mocarski.** 1994. Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 11879-11883.
- Kondo, K., and E. S. Mocarski.** 1995. Cytomegalovirus latency and latency-specific transcription in hematopoietic progenitors. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* **99**: 63-67.
- Kondo, K., J. Xu, and E. S. Mocarski.** 1996. Human cytomegalovirus latent gene expression in granulocyte-macrophage progenitors in culture and in seropositive individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 11137-11142.
- Koopman, G., C. P. M. Reutelingsperger, G. A. M. Kuijten, R. M. J. Keehnen, S. T. Pals, and M. H. J. van Oers.** 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* **84**: 1415-1420.
- Koszinowski, U. H., M. Del Val, and M. J. Reddehase.** 1990. Cellular and molecular basis of the protective immune response to cytomegalovirus infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **154**: 189-220.
- Krause, P., P. M. Markus, P. Schwartz, K. Unthan-Fechner, S. Pestel, J. Fandrey, and I. Probst.** 2000. Hepatocyte-supported serum-free culture of rat liver sinusoidal endothelial cells. *J. Hepatol.* **32**: 718-726.
- Krmpotic, A., I. Bubic, B. Polic, P. Lucin, and S. Jonjic.** 2003. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. *Microbes Infect.* **5**: 1263-1277.
- Kruh, J.** 1982. Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Mol. Cell. Biochem.* **42**: 65-82.
- Kubat, N. J., R. K. Tran, P. McAnany, and D. C. Bloom.** 2004. Specific histone tail modification and not DNA methylation is a determinant of herpes simplex virus type 1 latent gene expression. *J. Virol.* **78**: 1139-1149.
- Kudo, S., K. Matsuno, T. Ezaki, and M. Ogawa.** 1997. A novel migration pathway for rat dendritic cells from the blood: hepatic sinusoids-lymph translocation. *J. Exp. Med.* **185**: 777-784.
- Kuntz-Simon, G., and G. Obert.** 1995. Sodium butyrate, an anticonvulsant drug, stimulates human cytomegalovirus replication. *J. Gen. Virol.* **76**: 1409-1415.
- Kurz, S. K., M. Rapp, H. P. Steffens, N. K. A. Grzimek, S. Schmalz, and M. J. Reddehase.** 1999. Focal transcriptional activity of murine cytomegalovirus during latency in the lungs. *J. Virol.* **73**: 482-494.
- Kurz, S. K., and M. J. Reddehase.** 1999. Patchwork pattern of transcriptional reactivation in the lungs indicates sequential checkpoints in the transition from murine cytomegalovirus latency to recurrence. *J. Virol.* **73**: 8612-8622.

- Kurz, S., H. P. Steffens, A. Mayer, J. R. Harris, and M. J. Reddehase.** 1997. Latency versus persistence or intermittent recurrences: evidence for a latent state of murine cytomegalovirus in the lungs. *J. Virol.* **71**: 2980-2987.
- Lagasse, E., H. Connors, M. Al-Dhalimy, M. Reitsma, M. Dohse, L. Osborne, X. Wang, M. Finegold, I. L. Weissman, and M. Grompe.** 2000. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat. Med.* **6**: 1229-1234.
- Lalor, P. F., P. Shields, A. J. Grant, and D. H. Adams.** 2002. Recruitment of lymphocytes to the human liver. *Immunol. Cell Biol.* **80**: 52-64.
- Landolfo, S., M. Gariglio, G. Gribaudo, and D. Lembo.** 2003. The human cytomegalovirus. *Pharmacol. Ther.* **98**: 269-297.
- Larsson, S., C. Soderberg-Naucler, F. Z. Wang, and E. Moller.** 1998. Cytomegalovirus DNA can be detected in peripheral blood mononuclear cells from all seropositive and most seronegative healthy blood donors over time. *Transfusion* **38**: 271-278.
- Lau, A. H., and A. W. Thomson.** 2003. Dendritic cells and immune regulation in the liver. *Gut* **52**: 307-314.
- Lautenschlager, I., L. Halme, K. Höckerstedt, L. Krogerus, and E. Taskinen.** 2005. Cytomegalovirus infection of the liver transplant: virological, histological, immunological, and clinical observations. *Transpl. Infect. Dis.* **8**: 21-30.
- Lautenschlager, I., K. Höckerstedt, H. Jalanko, R. Loginov, K. Salmela, E. Taskinen, and J. Ahonen.** 1997. Persistent cytomegalovirus in liver allografts with chronic rejection. *Hepatology* **25**: 190-194.
- Lemström, K. B., J. H. Bruning, C. A. Bruggeman, I. T. Lautenschlager, and P. J. Häyry.** 1993. Cytomegalovirus infection enhances smooth muscle cell proliferation and intimal thickening of rat aortic allografts. *J. Clin. Invest.* **92**: 549-558.
- Lian, Z.-X., T. Okada, X.-S. He, H. Kita, Y.-J. Liu, A. A. Ansari, K. Kikuchi, S. Ikehara, and M. E. Gershwin.** 2003. Heterogeneity of dendritic cells in the mouse liver: identification and characterization of four distinct populations. *J. Immunol.* **170**: 2323-2330.
- Limmer, A., J. Ohi, C. Kurts, H. G. Ljunggren, Y. Reiss, M. Groettrup, F. Momburg, B. Arnold, and P. A. Knolle.** 2000. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8<sup>+</sup> T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat. Med.* **6**: 1348-1354.
- Lindl, T.** 2002. Zell- und Gewebekultur. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin.
- Loetscher, M., B. Gerber, P. Loetscher, S. A. Jones, L. Piali, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini, and B. Moser.** 1996. Chemokine receptor specific for IP10 and Mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J. Exp. Med.* **184**: 963-969.
- Lohse, A. W., P. A. Knolle, K. Bilo, A. Uhrig, C. Waldmann, M. Ibe, E. Schmitt, G. Gerken, and K. H. Meyer zum Büschenfelde.** 1996. Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells. *Gastroenterology* **110**: 1175-1181.
- Longo, N., N. S. Berninger, and J. L. Hartley.** 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* **93**: 125-128.
- Lutz, M. P., G. Gaedicke, and W. Hartmann.** 1992. Large-scale cell separation by centrifugal elutriation. *Analyt. Biochem.* **200**: 376-380.
- MacDonald, H. R.** 1995. NK1.1<sup>+</sup> T cell receptor- $\alpha/\beta$ <sup>+</sup> cells: new clues to their origin, specificity, and function. *J. Exp. Med.* **182**: 633-638.
- MacPhee, P. J., E. E. Schmidt, and A. C. Groom.** 1992. Evidence for Kupffer cell migration along liver sinusoids, from high-resolution *in vivo* microscopy. *Am. J. Physiol.* **263**: G17-G23.

- MacPhee, P. J., E. E. Schmidt, and A. C. Groom.** 1995. Intermittence of blood flow in liver sinusoids, studied by high-resolution in vivo microscopy. *Am. J. Physiol.* **269**: G692-G698.
- Mangin, M., K. Ikeda, and A. E. Broadus.** 1990. Structure of the mouse gene encoding parathyroid hormone-related peptide. *Gene* **95**: 195-202.
- Marelli-Berg, F. M., E. Peek, E. A. Lidington, H. J. Stauss, and R. I. Lechler.** 2000. Isolation of endothelial cells from murine tissue. *J. Immunol. Methods* **244**: 205-215.
- Marks, J. R., and D. H. Spector.** 1984. Fusion of the termini of the murine cytomegalovirus genome after infection. *J. Virol.* **52**: 24-28.
- Marks, J. R., and D. H. Spector.** 1988. Replication of the murine cytomegalovirus genome: structure and role of the termini in the generation and cleavage of concatamers. *Virology* **162**: 98-107.
- Marrak, P., and J. Kappler.** 1987. The T cell receptor. *Science* **238**: 1073-1079.
- Matsuno, K., T. Ezaki, S. Kudo, and Y. Uehara.** 1996. A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: their terminal division, active phagocytosis, and translocation from the liver to the draining lymph. *J. Exp. Med.* **183**: 1865-1878.
- Mayo, D. R., J. A. Armstrong, and M. Ho.** 1977. Reactivation of murine cytomegalovirus by cyclophosphamide. *Nature* **267**: 721-723.
- Mayo, D. R., J. A. Armstrong, and M. Ho.** 1978. Activation of latent murine cytomegalovirus infection: cocultivation, cell transfer, and the effect of immunosuppression. *J. Infect. Dis.* **138**: 890-896.
- Medina, V., B. Edmonds, G. P. Young, R. James, S. Appleton, and P. D. Zalewski.** 1997. Induction of caspase-3 protease activity and apoptosis by butyrate and trichostatin A (inhibitors of histone deacetylase): dependence on protein synthesis and synergy with a mitochondrial/cytochrome c-dependent pathway. *Cancer Res.* **57**: 3697-3707.
- Meier, J. L.** 2001. Reactivation of the human cytomegalovirus major immediate-early regulatory region and viral replication in embryonal NTera2 cells: role of trichostatin A, retinoic acid, and the deletion of the 21-base-pair repeats and modulator. *J. Virol.* **75**: 1581-1593.
- Meier, J. L., and M. F. Stinski.** 2006. Major immediate-early enhancer and its gene products, p. 151-166. *In* M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Melnick, J. L., C. Hu, J. Burek, E. Adam, and M. E. DeBakey.** 1994. Cytomegalovirus DNA in arterial walls of patients with atherosclerosis. *J. Med. Virol.* **42**: 170-174.
- Melnick, J. L., B. L. Petrie, G. R. Dreesman, J. Burek, C. H. McCollum, and M. E. DeBakey.** 1983. Cytomegalovirus antigen within human arterial smooth muscle cells. *Lancet* **17**: 644-647.
- Mendelson, M., S. Monard, P. Sissons, and J. Sinclair.** 1996. Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34<sup>+</sup> bone marrow progenitors. *J. Gen. Virol.* **77**: 3099-3102.
- Mercer, J. A., C. A. Wiley, and D. H. Spector.** 1988. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection: identification of infected cells in the spleen during acute and latent infections. *J. Virol.* **62**: 987-997.
- Messerle, M., B. Bühler, G. M. Keil, and U. H. Koszinowski.** 1992. Structural organization, expression, and functional characterization of the murine cytomegalovirus immediate-early 3. *J. Virol.* **66**: 27-36.
- Metcalf, D.** 1989. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature* **339**: 27-30.

- Michaelis, M., N. Köhler, A. Reinisch, D. Eikel, U. Gravemann, H. W. Doerr, H. Nau, and J. Cinatl Jr.** 2004. Increased human cytomegalovirus replication in fibroblasts after treatment with therapeutical plasma concentrations of valproic acid. *Biochem. Pharmacol.* **68**: 531-538.
- Miltenyi, S., W. Müller, W. Weichel, and A. Radbruch.** 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* **11**: 231-238.
- Minton, E. J., C. Tysoe, J. H. Sinclair, and J. G. P. Sissons.** 1994. Human cytomegalovirus infection of the monocyte/macrophage lineage in bone marrow. *J. Virol.* **68**: 4017-4021.
- Mitchell, B. M., A. Leung, and J. G. Stevens.** 1996. Murine cytomegalovirus DNA in peripheral blood of latently infected mice is detectable only in monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *Virology* **223**: 198-207.
- Mocarski, E. S., and C. T. Courcelle.** 2001. Cytomegalovirus and their replication, p. 2629-2673. *In*: Fields Virology 4<sup>th</sup> Edition.
- Mocarski, E. S. Jr., G. Hahn, K. Lofgren White, J. Xu, B. Slobedman, L. Hertel, S. A. Aguirre, and S. Noda.** 2006. Myeloid cell recruitment and function in pathogenesis and latency, p. 465-481. *In* M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Morin, O., P. Patry, and L. Lafleur.** 1984. Heterogeneity of endothelial cells of adult rat liver as resolved by sedimentation velocity and flow cytometry. *J. Cell. Physiol.* **119**: 327-334.
- Moser, B., M. Wolf, A. Walz, and P. Loetscher.** 2004. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol.* **25**: 75-84.
- Mullis, K. B., and F. A. Faloona.** 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**: 335-350.
- Murdoch, C., and A. Finn.** 2000. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* **95**: 3032-3043.
- Murphy, J. C., W. Fischle, E. Verdin, and J. H. Sinclair.** 2002. Control of cytomegalovirus lytic gene expression by histone acetylation. *EMBO J.* **21**: 1112-1120.
- Murphy, E., I. Rigoutsos, T. Shibuya, and T. E. Shenk.** 2003a. Reevaluation of human cytomegalovirus coding potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 13585-13590.
- Murphy, E., D. Yu, J. Grimwood, J. Schmutz, M. Dickson, M. A. Jarvis, G. Hahn, J. A. Nelson, R. M. Myers, and T. E. Shenk.** 2003b. Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 14976-14981.
- Mutter, W., M. J. Reddehase, F. W. Busch, H. J. Bühring, and U. H. Koszinowski.** 1988. Failure in generating hemopoietic stem cells is the primary cause of death from cytomegalovirus disease in the immunocompromised host. *J. Exp. Med.* **167**: 1645-1658.
- Myerson, D., R. C. Hackmann, J. A. Nelson, D. C. Ward, and J. K. McDougall.** 1984. Widespread presence of histologically occult cytomegalovirus. *Hum. Pathol.* **15**: 430-439.
- Naito, M., G. Hasegawa, Y. Ebe, and T. Yamamoto.** 2004. Differentiation and function of Kupffer cells. *Med. Electron Microsc.* **37**: 16-28.
- Nakatani, K., K. Kaneda, S. Seki, and Y. Nakajima.** 2004. Pit cells as liver-associated natural killer cells: morphology and function. *Med. Electron. Microsc.* **37**: 29-36.
- Newman, P. J.** 1996. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. The biology of PECAM-1. *J. Clin. Invest.* **99**: 3-8.
- Newman, P. J.** 1999. Switched at birth: a new family for PECAM-1. *J. Clin. Invest.* **103**: 5-9.

- Newman, P. J., M. C. Berndt, J. Gorski, G. C. White 2nd, S. Lyman, C. Paddock, and W. A. Muller.** 1990. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* **247**: 1219-1222.
- Nonaka, H., S. Sugano, and A. Miyajima.** 2004. Serial analysis of gene expression in sinusoidal endothelial cells from normal and injured mouse liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**: 15-24.
- Norris, S., C. Collins, D. G. Doherty, F. Smith, G. McEntee, O. Traynor, N. Nolan, J. Hegarty, and C. O'Farrelly.** 1998. Resident human lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes. *J. Hepatol.* **28**: 84-90.
- Novotny, J., I. Rigoutsos, D. Coleman, and T. Shenk.** 2001. In silico structural and functional analysis of the human cytomegalovirus (HHV5) genome. *J. Mol. Biol.* **310**: 1151-1166.
- Ogawa-Goto, K., K. Tanaka, W. Gibson, E. Moriishi, Y. Miura, T. Kurata, S. Irie, and T. Sata.** 2003. Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. *J. Virol.* **77**: 8541-8547.
- O'Grady, J. G., G. J. Alexander, S. Sutherland, P. T. Donaldson, F. Harvey, B. Portmann, R. Y. Calne, and R. Williams.** 1988. Cytomegalovirus infection and donor/recipient HLA antigens: interdependent co-factors in pathogenesis of vanishing bile-duct-syndrome after liver transplantation. *Lancet* **2**: 302-305.
- Oldakowska-Jedynak, U., M. Niewczas, J. Ziolkowski, K. Mucha, B. Foroniewicz, I. Bartlomiejczyk, G. Senatorski, J. Wyzgal, M. Krawczyk, K. Zieniewicz, P. Nyckowski, and L. Paczek.** 2003. Cytomegalovirus infection as a common complication following liver transplantation. *Transplant. Proc.* **35**: 2295-2297.
- Olding, L. B., F. C. Jensen, and M. B. A. Oldstone.** 1975. Pathogenesis of cytomegalovirus infection. *J. Exp. Med.* **141**: 561-572.
- Olding, L. B., D. T. Kingsbury, and M. B. A. Oldstone.** 1976. Pathogenesis of cytomegalovirus infection. Distribution of viral products, immune complexes and autoimmunity during latent murine infection. *J. Gen. Virol.* **33**: 267-280.
- Osborn, L., C. Hession, R. Tizard, C. Vassallo, S. Luhowskyj, G. Chi-Rosso, and R. Lobb.** 1989. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* **59**: 1203-1211.
- Pampou, S. Y., S. N. Gnedoy, V. B. Bystrevskaya, V. N. Smirnov, E. I. Chazov, J. L. Melnick, and M. E. DeBakey.** 2000. Cytomegalovirus genome and the immediate-early antigen in cells of different layers of human aorta. *Virchows Arch.* **436**: 539-552.
- Paradis, K., B. Blazar, and H. L. Sharp.** 1989. Rapid repopulation and maturation of Kupffer cells from the bone marrow in a murine bone marrow transplant model, p. 410-412. *In: Wisse E., D. L. Knook (eds.), Cells of the hepatic sinusoid, vol 2. Kupffer cell foundation, Rijswijk.*
- Pass, R. F.** 2001. Cytomegalovirus, p. 2675-2705. *In: Fields Virology 4<sup>th</sup> Edition.*
- Paya, C. V., R. H. Wiesner, P. E. Hermans, J. J. Larson-Keller, D. M. Ilstrup, R. A. Krom, S. B. Moore, J. Ludwig, and T. F. Smith.** 1992. Lack of association between cytomegalovirus infection, HLA matching and the vanishing bile duct syndrome after liver transplantation. *Hepatology* **16**: 66-70.
- Percivalle, E., M. G. Revello, L. Vago, F. Morini, and G. Gerna.** 1993. Circulating endothelial giant-cells permissive for human cytomegalovirus (HCMV) are detected in disseminated HCMV infections with organ involvement. *J. Clin. Invest.* **92**: 663-670.
- Pietropaolo, R., and T. Compton.** 1999. Interference with annexin II has no effect on entry of human cytomegalovirus into fibroblast cells. *J. Gen. Virol.* **80**: 1807-1816.

- Podlech, J., R. Holtappels, M. F. Pahl-Seibert, H. P. Steffens, and M. J. Reddehase.** 2000. Murine model of interstitial cytomegalovirus pneumonia in syngeneic bone marrow transplantation: persistence of protective pulmonary CD8-T-cell infiltrates after clearance of acute infection. *J. Virol.* **74**: 7496-7507.
- Podlech, J., R. Holtappels, N. Wirtz, H. P. Steffens, and M. J. Reddehase.** 1998. Reconstitution of CD8 T cells is essential for the prevention of multiple-organ cytomegalovirus histopathology after bone marrow transplantation. *J. Gen. Virol.* **79**: 2099-2104.
- Polić, B., H. Hengel, A. Krmpotić, J. Trgovich, I. Pavić, P. Lučin, S. Jonjić, and U. H. Koszinowski.** 1998. Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *J. Exp. Med.* **188**: 1047-1054.
- Pollock, J. L., and H. W. Virgin IV.** 1995. Latency, without persistence, of murine cytomegalovirus in the spleen and kidney. *J. Virol.* **69**: 1762-1768.
- Pollock, J. L., R. M. Presti, S. Paetzold, and H. W. Virgin IVth.** 1997. Latent murine cytomegalovirus infections in macrophages. *Virology* **227**: 168 -179.
- Pomeroy, C., P. J. Hilleren, and M. C. Jordan.** 1991. Latent murine cytomegalovirus DNA in splenic stromal cells of mice. *J. Virol.* **65**: 3330-3334.
- Porter, K. R., D. M. Starnes, and J. D. Hamilton.** 1985. Reactivation of latent murine cytomegalovirus from kidney. *Kidney Int.* **28**: 922-925.
- Powell-Jackson, P. R., J. M. Tredger, and R. Williams.** 1984. Hepatotoxicity to sodium valproate: a review. *Gut* **25**: 673-681.
- Presti, R. M., J. L. Pollock, A. J. Dal Canto, A. K. O'Guin, and H. W. Virgin IV.** 1998. Interferon  $\gamma$  regulates acute and latent murine cytomegalovirus infection and chronic disease of the great vessels. *J. Exp. Med.* **188**: 577-588.
- Prickett, T. C., J. L. McKenzie, and D. N. Hart.** 1988. Characterization of interstitial dendritic cells in human liver. *Transplantation* **46**: 754-761.
- Quinnan, G. V., J. E. Manischewitz, and F. A. Ennis.** 1978. Cytotoxic T lymphocyte response to murine cytomegalovirus infection. *Nature* **273**: 541-543.
- Quirici, N., D. Soligo, L. Caneva, F. Servida, P. Bossolasco, and G. L. Deliliers.** 2001. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133<sup>+</sup> cells. *Brit. J. Haematol.* **115**: 186-194.
- Racanelli, V., and B. Rehermann.** 2006. The liver as an immunological organ. *Hepatology* **43**: S54-S62.
- Radsak, K., R. Fuhrmann, R. P. Franke, D. Schneider, A. Kollert, K. H. Brücher, and D. Drenckhahn.** 1989. Induction by sodium butyrate of cytomegalovirus replication in human cells. *Arch. Virol.* **107**: 151-158.
- Raftery, M. J., M. Schwab, S. M. Eibert, Y. Samstag, H. Walczak, and G. Schonrich.** 2001. Targeting the function of mature dendritic cells by human cytomegalovirus: a multilayered viral defense strategy. *Immunity* **15**: 997-1009.
- Ramadori, G., and T. Armbrust.** 2001. Cytokines in the liver. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **13**: 777-784.
- Rapp, M., M. Messerle, B. Bühler, M. Tannheimer, G. M. Keil, and U. H. Koszinowski.** 1992. Identification of the murine cytomegalovirus glycoprotein B gene and its expression by recombinant vaccinia virus. *J. Virol.* **66**: 4399-4406.



- Rasmussen, R.** 2001. Quantification on the LightCycler, p. 21-34. *In* S. Meuer, C. Wittwer, K.-I. Nakagawara (eds.), Rapid Cycler Real-Time PCR: methods and applications. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Rawlinson, W. D., H. E. Farrell, and B. G. Barrell.** 1996. Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J. Virol.* **70**: 8833-8849.
- Reddehase, M. J.** 1991. Bone marrow dysfunction in irradiated, cytomegalovirus-infected mice. *Transplant. Proc.* 3 Suppl. **23**: 8-11.
- Reddehase, M. J.** 2002. Antigen and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nat. Rev. Immunol.* **2**: 831-844.
- Reddehase, M. J., M. Balthesen, M. Rapp, S. Jonjic, I. Pavic, and U. H. Koszinowski.** 1994. The conditions of primary infections define the load of latent viral genome in organs and the risk of recurrent cytomegalovirus disease. *J. Exp. Med.* **179**: 185-193.
- Reddehase, M. J., W. Mutter, K. Münch, H. J. Buhning, and U. H. Koszinowski.** 1987. CD8 positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. *J. Virol.* **61**: 3102-3108.
- Reddehase, M. J., J. Podlech, and N. K. A. Grzimek.** 2002. Mouse models of cytomegalovirus latency: overview. *J. Clin. Virol.* **25**: 23-36.
- Reddehase, M. J., C. O. Simon, C. K. Seckert, N. Lemmermann, and N. K. A. Grzimek.** 2007. Murine model of cytomegalovirus latency and reactivation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, in press.
- Reddehase, M. J., F. Weiland, K. Munch, S. Jonjic, A. Lüske, and U. H. Koszinowski.** 1985. Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *J. Virol.* **55**: 264-273.
- Reeves, M. B., H. Coleman, J. Chadderton, M. Goddard, J. G. P. Sissons, and J. H. Sinclair.** 2004. Vascular endothelial cells and smooth muscle cells are unlikely to be major sites of latency of human cytomegalovirus *in vivo*. *J. Gen. Virol.* **85**: 3337-3341.
- Reeves, M. B., P. A. MacAry, P. J. Lehner, J. G. P. Sissons, and J. H. Sinclair.** 2005. Latency, chromatin remodelling, and reactivation of human cytomegalovirus in the dendritic cells of healthy carriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 4140-4145.
- Rickwood, D., T. Ford, and J. Graham.** 1982. Nycodenz: a new non-ionic iodinated gradient medium. *Anal. Biochem.* **123**: 23-31.
- Ricousse-Roussanne, S. L., V. Barateau, J.-O. Contreres, B. Boval, L. Kraus-Berthier, and G. Tobelem.** 2004. Ex vivo differentiated endothelial and smooth muscle cells from human cord blood progenitors home to the angiogenic tumor vasculature. *Cardiovasc. Res.* **62**: 176-184.
- Roizman, B., and W. Batterson.** 1986. Herpesviruses and their replication, p. 607-636. *In*: Fields, B. N. & D. M. Knipe (eds.), *Fundamental Virology*, Raven Press, New York.
- Roizman, B., L. E. Carmichael, F. Deinhardt, G. de-The, A. J. Nahimas, W. Plowright, F. Rapp, P. Sheldrick, M. Takahashi, and K. Wolf.** 1981. Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The herpesvirus study group, the international committee on taxonomy of viruses. *Intervirology* **16**: 201-217.
- Roizman, B., R. C. Desrosiers, B. Fleckenstein, C. Lopez, A. C. Minson, and M. J. Studdert.** 1992. The family *herpesviridae*: an update. *Arch. Virol.* **123**: 426-449.
- Roizman, B., and E. P. Pellett.** 2001. The family *herpesviridae*: a brief introduction, p. 2381-2397. *In*: *Fields Virology* 4<sup>th</sup> Edition.
- Roizman, B., and A. E. Sears.** 1987. An inquiry into the mechanisms of herpes simplex virus latency. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**: 543-571.

- Rubinstein, D., A. K. Roska, and P. E. Lipsky.** 1986. Liver sinusoidal lining cells express class II major histocompatibility antigens but are poor stimulators of fresh allogeneic T lymphocytes. *J. Immunol.* **137**: 1803-1810.
- Rubinstein, D., A. K. Roska, and P. E. Lipsky.** 1987. Antigen presentation by liver sinusoidal lining cells after antigen exposure in vivo. *J. Immunol.* **138**: 1377-1382.
- Ruebner, B. H., K. Miyai, R. J. Slusser, P. Wedemeyer, and D. N. Medearis Jr.** 1964. Mouse cytomegalovirus infection. An electron microscopic study of hepatic parenchymal cells. *Am. J. Pathol.* **44**: 799-821.
- Ruminy, P., C. Gangneux, S. Claeysens, M. Scotte, M. Daveau, and J.-P. Salier.** 2001. Gene transcription in hepatocytes during the acute phase of systemic inflammation: from transcription factors to target genes. *Inflamm. Res.* **50**: 383-390.
- Rutledge, R. G., and C. Côté.** 2003. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nuc. Acids Res.* **31**: e93.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Salahuddin, S. Z., D. V. Ablashi, P. D. Markham, S. F. Josephs, S. Sturzenegger, M. Kaplan, G. Halligan, P. Biberfeld, F. Wong-Staal, B. Kramarsky, and R. C. Gallo.** 1986. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science* **234**: 596-601.
- Sambrook, J., and D. W. Russel.** 2001. *Molecular cloning, a laboratory manual.* Cold Spring Harbour Laboratory press, Cold Spring Harbour, N.Y.
- Sato, M., S. Suzuki, and H. Senoo.** 2003. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct. Funct.* **28**: 105-112.
- Schmader, K., S. C. Henry, R. J. Rahija, Y. Yu, G. G. Daley, and J. D. Hamilton.** 1995. Mouse cytomegalovirus reactivation in severe combined immune deficient mice after implantation of latently infected salivary gland. *J. Infect. Dis.* **172**: 531-534.
- Schneweis, K. E.** 1962. Serologische Untersuchungen zur Typendifferenzierung des Herpesvirus Hominis. *Z. Immunitätsforsch. Exp. Ther.* **124**: 24-48.
- Scoazec, J.-Y., and G. Feldmann.** 1990. Both macrophages and endothelial cells of the human hepatic sinusoids express the CD4 molecule, a receptor for the human immunodeficiency virus. *Hepatology* **12**: 505-510.
- Scoazec, J.-Y., and G. Feldmann.** 1991. In situ immunophenotyping study of endothelial cells of the human hepatic sinusoid: results and functional implications. *Hepatology* **14**: 789-797.
- Scoazec, J.-Y., and G. Feldmann.** 1994. The cell adhesion molecules of hepatic sinusoidal endothelial cells. *J. Hepatol.* **20**: 296-300.
- Seglen, P. O.** 1972. Preparation of rat liver cells. *Exp. Cell Res.* **74**: 450-454.
- Seglen, P. O.** 1973a. Preparation of rat liver cells. *Exp. Cell Res.* **76**: 25-30.
- Seglen, P. O.** 1973b. Preparation of rat liver cells. *Exp. Cell Res.* **82**: 391-398.
- Seifter, S., and E. Harper.** 1970. Collagenases. *Meth. Enzymol.* **19**: 613-635.
- Shanley, J. D., M. C. Jordan, M. L. Cook, and J. G. Stevens.** 1979. Pathogenesis of reactivated latent murine cytomegalovirus infection. *Am. J. Pathol.* **95**: 67-80.

- Shenk, T.** 2006. Human cytomegalovirus genomics, p. 49-61. *In* M. J. Reddehase (ed.), Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Shields, P. L., C. M. Morland, M. Salmon, S. Qin, S. G. Hubscher, and D. H. Adams.** 1999. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *J. Immunol.* **163**: 6236-6243.
- Simon, C. O., R. Holtappels, H.-V. Tervo, V. Böhm, T. Däubner, S. A. Oehrlein-Karpi, B. Kühnapfel, A. Renzaho, D. Strand, J. Podlech, M. J. Reddehase, and N. K. A. Grzimek.** 2006a. CD8 T cells control cytomegalovirus latency by epitope-specific sensing of transcriptional reactivation. *J. Virol.* **80**: 10436-10456.
- Simon, C. O., C. K. Seckert, D. Dreis, M. J. Reddehase, and N. K. A. Grzimek.** 2005. Role for tumor necrosis factor alpha in murine cytomegalovirus transcriptional reactivation in latently infected lungs. *J. Virol.* **79**: 326-340.
- Simon, C. O., C. K. Seckert, N. K. A. Grzimek, and M. J. Reddehase.** 2006b. Murine model of cytomegalovirus latency and reactivation: the silencing/desilencing and immune sensing hypothesis, p. 483-500. *In* M. J. Reddehase (ed.), Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Sinclair, J., and P. Sissons.** 1996. Latent and persistent infections of monocytes and macrophages. *Intervirology* **39**: 293-301.
- Sinzger, C., A. L. Bissinger, R. Viebahn, H. Oettle, C. Radke, C. A. Schmidt, and G. Jahn.** 1999. Hepatocytes are permissive for human cytomegalovirus infection in human liver cell culture and in vivo. *J. Infect. Dis.* **180**: 976-986.
- Sinzger, C., A. Grefte, B. Plachter, A. S. Gouw, T. H. The, and G. Jahn.** 1995. Fibroblasts, epithelial cells endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J. Gen. Virol.* **76**: 741-750.
- Sinzger, C., and G. Jahn.** 1996. Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology* **39**: 302-319.
- Slobedman, B., and E. S. Mocarski.** 1999. Quantitative analysis of latent human cytomegalovirus. *J. Virol.* **73**: 4806-4812.
- Smedsrød, B., H. Pertoft, S. Gustafson, and T. C. Laurent.** 1990. Scavenger functions of the liver endothelial cell. *Biochem. J.* **266**: 313-327.
- Smith, M. G.** 1954. Propagation of salivary gland virus of the mouse in tissue cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **86**: 435-440.
- Smith, M. G.** 1956. Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **92**: 424-430.
- Söderberg-Nauclér, C., K. N. Fish, and J. A. Nelson.** 1997a. Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  specifically induce formation of cytomegalovirus-permissive monocyte-derived macrophages that are refractory to the antiviral activity of these cytokines. *J. Clin. Invest.* **100**: 3154-3163.
- Söderberg-Nauclér, C., K. N. Fish, and J. A. Nelson.** 1997b. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* **91**: 119-126.
- Söderberg-Nauclér, C., and J. A. Nelson.** 1999. Human cytomegalovirus latency and reactivation – a delicate balance between the virus and its host's immune system. *Intervirology* **42**: 314-321.
- Spector, S. A., K. Hsia, M. Crager, M. Pilcher, S. Cabral, and M. J. Stempien.** 1999. Cytomegalovirus (CMV) DNA load is an independent predictor of CMV disease and survival in advanced AIDS. *J. Virol.* **73**: 7027-7030.

- Stagno, S., R. F. Pass, M. E. Dworsky, R. E. Henderson, E. G. Moore, P. D. Walton, and C. A. Alford.** 1982. Congenital cytomegalovirus infection: the relative importance of primary and recurrent maternal infection. *N. Engl. J. Med.* **306**: 945-949.
- Stagno, S., and R. J. Whitley.** 1985. Herpesvirus infections of pregnancy. Part I: cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infections. *N. Engl. J. Med.* **313**: 1270-1274.
- Steffan, A.-M., J.-L. Gendrault, R. S. McCuskey, P. A. McCuskey, and A. Kirn.** 1986. Phagocytosis, an unrecognized property of murine endothelial liver cells. *Hepatology* **6**: 830-836.
- Steffens, H. P., S. Kurz, R. Holtappels, and M. J. Reddehase.** 1998a. Preemptive CD8 T-cell immunotherapy of acute cytomegalovirus infection prevents lethal disease, limits the burden of latent viral genomes, and reduces the risk of virus recurrence. *J. Virol.* **72**: 1797-1804.
- Steffens, H. P., J. Podlech, S. Kurz, P. Angele, D. Dreis, and M. J. Reddehase.** 1998b. Cytomegalovirus inhibits the engraftment of donor bone marrow cells by downregulation of hemopoietin gene expression in recipient stroma. *J. Virol.* **72**: 5006-5015.
- Stinski, M. F., C. L. Malone, T. W. Hermiston, and B. Liu.** 1991. Regulation of human cytomegalovirus transcription, p. 245-260. *In*: Wagner E.K. (ed.), *Herpesvirus transcription and its control*. Boca Raton: CRC Press.
- Streblow, D. N., and J. A. Nelson.** 2003. Models of HCMV latency and reactivation. *Trends Microbiol.* **11**: 293-295.
- Streblow, D. N., S. M. Varnum, R. D. Smith, and J. A. Nelson.** 2006. A proteomics analysis of human cytomegalovirus particles, p. 91-110. *In* M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Tang, Q., and G. Maul.** 2003. Mouse cytomegalovirus immediate-early protein 1 binds with host cell repressors to relieve suppressive effects of viral transcription and replication during lytic infection. *J. Virol.* **77**: 1357-1367.
- Tang, Q., and G. Maul.** 2006. Immediate-early interactions and epigenetic defense mechanisms, p. 131-149. *In* M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Tang, Q., E. A. Murphy, and G. Maul.** 2006. Experimental confirmation of global murine cytomegalovirus open reading frames by transcriptional detection and partial characterisation of newly described gene products. *J. Virol.* **80**: 6873-6882.
- Taylor, A. C.** 1997. Titration of heparinase for removal of the PCR-inhibitory effect of heparin in DNA samples. *Mol. Ecol.* **6**: 383-385.
- Taylor-Wiedeman, J., G. P. Hayhurst, J. G. P. Sissons, and J. H. Sinclair.** 1993. Polymorphonuclear cells are not sites of persistence of human cytomegalovirus in healthy individuals. *J. Gen. Virol.* **74**: 265-268.
- Taylor-Wiedeman, J., J. G. P. Sissons, L. K. Borysiewicz, and J. H. Sinclair.** 1991. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J. Gen. Virol.* **72**: 2059-5064.
- Taylor-Wiedeman, J. A., J. G. P. Sissons, and J. H. Sinclair.** 1994. Induction of endogenous human cytomegalovirus gene expression after differentiation of monocytes from healthy carriers. *J. Virol.* **68**: 1597-1604.
- Theise, N. D., S. Badve, R. Saxena, O. Henegariu, S. Sell, J. M. Crawford, and D. S. Krause.** 2000a. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* **31**: 235-240.

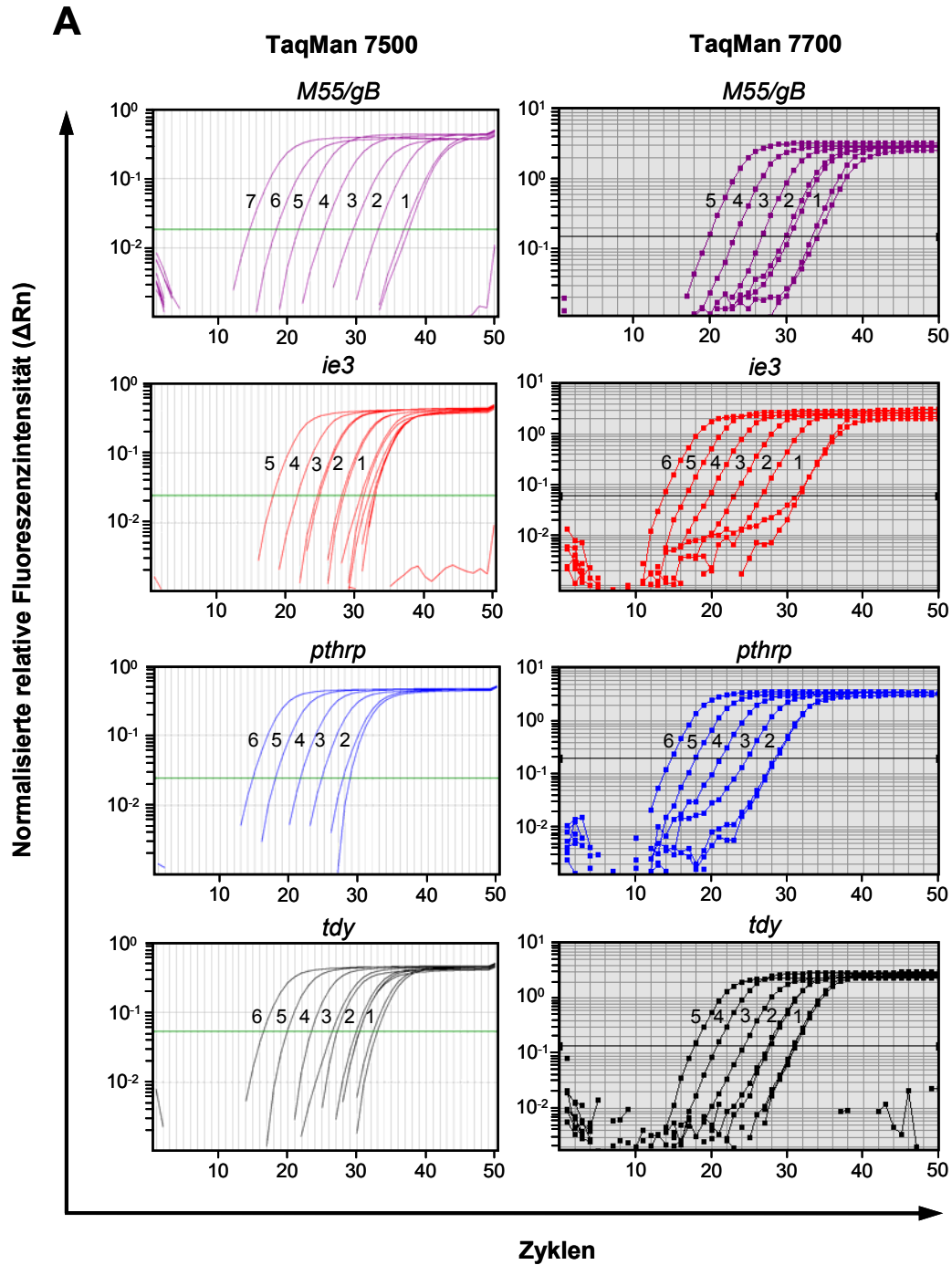
- Theise, N. D., M. Nimmakayalu, R. Gardner, P. B. Illei, G. Morgan, L. Teperman, O. Henegariu, and D. S. Krause.** 2000b. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* **32**: 11-16.
- Thomson, A. W., M. L. Drakes, A. F. Zahorchak, P. J. O'Connell, R. J. Steptoe, S. Qian, and L. Lu.** 1999. Hepatic dendritic cells: immunobiology and role in liver transplantation. *J. Leukoc. Biol.* **66**: 322-330.
- Trinchieri, G.** 1989. Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.* **47**: 187-376.
- Van de Water, J., C. T. Wu, L. Lu, and A. W. Thomson.** 2003. Dendritic cells and other antigen-presenting cells of the liver and in liver disease, p. 99-114. *In*: M. E. Gershwin, J. M. Vierling, and M. P. Manns (eds.), *Liver immunology*, Philadelphia, PA, Hanley & Belfus, Inc.
- Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken, and C. Reutelingsperger.** 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Meth.* **184**: 39-51.
- Vidal-Vanaclocha, F., M. Rocha, A. Asumendi, and E. Barberá-Guillem.** 1993. Isolation and enrichment of two sublobular compartment-specific endothelial cell subpopulations from liver sinusoids. *Hepatology* **18**: 328-339.
- Vierling, J. M., and R. H. Fennel.** 1985. Histopathology of early and late human hepatic allograft rejection: evidence of progressive destruction of interlobular bile ducts. *Hepatology* **5**: 1076-1082.
- Vogelstein, B., and D. Gillespie.** 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 615-619.
- Volpes, R., J. J. van den Oord, and V. J. Desmet.** 1992. Vascular adhesion molecules in acute and chronic liver inflammation. *Hepatology* **15**: 269-275.
- Voyta, J. C., D. P. Via, C. E. Butterfield, and B. R. Zetter.** 1984. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J. Cell Biol.* **99**: 2034-2040.
- Wang, H. H., D. M. Nance, and F. W. Orr.** 1999. Murine hepatic microvascular adhesion molecule expression is inducible and has a zonal distribution. *Clin. Exp. Metastasis* **17**: 149-155.
- Wang, X., S. M. Huong, M. L. Chiu, N. Raab-Traub, and E. S. Huang.** 2003. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* **424**: 456-461.
- Warren, A., P. Bertolino, V. Benseler, R. Fraser, G. W. McCaughan, and D. G. Le Couteur.** 2007. Marked changes of the hepatic sinusoid in a transgenic mouse model of acute immune-mediated hepatitis. *J. Hepatol.* **46**: 239-246.
- Warren, A., D. G. Le Couteur, R. Fraser, D. G. Bowen, G. W. McCaughan, and P. Bertolino.** 2006. T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* **44**: 1182-1190.
- Watanabe, H., C. Miyaji, Y. Kawachi, T. Iiai, K. Ohtsuka, T. Iwanaga, H. Takahashi-Iwanaga, and T. Abo.** 1995. Relationships between intermediate TCR cells and NK1.1+ T cells in various immune organs. NK1.1+ T cells are present within a population of intermediate TCR cells. *J. Immunol.* **6**: 2972-2983.
- Weiland, F., G. M. Keil, M. J. Reddehase, and U. H. Koszinowski.** 1986. Studies on the morphogenesis of murine cytomegalovirus. *Intervirology* **26**: 192-201.
- Weisgraber, K. H., T. L. Innerarity, and R. W. Mahley.** 1978. Role of the lysine residues of plasma lipoproteins in high affinity binding to cell surface receptors on human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **253**: 9053-9062.
- Weller, T. H., J. B. Hanshaw, and D. E. Scott.** 1960. Serology differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. *Virology* **12**: 130-132.

- Welsh, R. M., J. O. Brubaker, M. Vargas-Cortes, and C. L. O'Donnell.** 1991. Natural killer (NK) cell response to virus infections in mice with severe combined immunodeficiency. The stimulation of NK cells and the NK cell-dependent control of virus infections occur independently of T and B cell function. *J. Exp. Med.* **173**: 1053-1063.
- White, K. L., B. Slobedman, and E. S. Mocarski.** 2000. Human cytomegalovirus latency-associated protein pORF94 is dispensable for productive and latent infection. *J. Virol.* **74**: 9333-9337.
- Wiesner, R. H., E. Marin, M. K. Porayko, J. L. Steers, R. A. Krom, and C. V. Paya.** 1993. Advances in the diagnosis, treatment and prevention of cytomegalovirus infections after liver transplantations. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **22**: 351-366.
- Wilfinger, W. W., K. Mackey, and P. Chomczynski.** 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* **22**: 474-481.
- Wilson, R., and M. K. Johansson.** 2003. Photoluminescence and electrochemiluminescence of a Ru(II)(bpy)<sub>3</sub>-quencher dual-labeled oligonucleotide probe. *Chem. Commun.* **21**: 2710-2711.
- Wiltrout, R. H.** 2000. Regulation and antimetastatic functions of liver-associated natural killer cells. *Immunol. Rev.* **174**: 63-76.
- Winnock, M., M. Garcia-Barcina, B. Lukomska, S. Huet, J. Saric, C. Balabaud, and P. Bioulac-Sage.** 1995. Human liver-associated lymphocytes: an overview. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **10**: S43-S46.
- Wise, T. G., J. E. Manischewitz, G. V. Quinnan, G. S. Aulakh, and F. A. Ennis.** 1979. Latent cytomegalovirus infection of BALB/c mouse spleens detected by an explant culture technique. *J. Gen. Virol.* **44**: 551-556.
- Wisse, E.** 1970. An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *J. Ultrastruct. Res.* **31**: 125-150.
- Wisse, E.** 1974a. Observations on the fine structure and peroxidase cytochemistry of normal rat liver Kupffer cells. *J. Ultrastruct. Res.* **46**: 393-426.
- Wisse, E.** 1974b. Kupffer cell reactions in rat liver under various conditions as observed in the electron microscope. *J. Ultrastruct. Res.* **46**: 499-520.
- Wisse, E., F. Braet, D. Luo, R. de Zanger, D. Jans, E. Crabbé, and A. Vermoesen.** 1996. Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver. *Toxicol. Pathol.* **24**: 100-111.
- Wisse, E., J. M. van't Noordende, J. van der Meulen, and W. T. Daems.** 1976. The pit cell: description of a new type of cell occurring in rat liver and peripheral blood. *Cell Tiss. Res.* **173**: 423-435.
- Wisse, E., R. B. de Zanger, K. Charels, P. van der Smissen, and R. S. McCuskey.** 1985. The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. *Hepatology* **5**: 683-692.
- Wittwer, C. T., K. M. Ririe, R. V. Andrew, D. A. David, R. A. Gundry, and U. J. Balis.** 1997. The Light Cycler™: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* **22**: 176-181.
- Woodle, E. S., G. A. Perdrizet, M. D. Jendrisak, H. M. White, and J. W. Marsh.** 1993. FK 506 rescue therapy: the rapidity of rejection reversal is related to the subsequent development of CMV disease. *Transplant. Proc.* **25**: 1992-1993.
- Wright, J. F., A. Kurosky, E. L. Pryzdial, and S. Wasi.** 1995. Host cellular annexin II is associated with cytomegalovirus particles isolated from cultured human fibroblasts. *J. Virol.* **69**: 4784-4791.
- Wright, J. F., A. Kurosky, and S. Wasi.** 1994. An endothelial cell-surface form of annexin II binds human cytomegalovirus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198**: 983-989.

- Wu, H.-Y., and M. W. Russell.** 1992. Antibody-secreting cell responses in the mouse liver. *Immunology* **77**: 443-448.
- Yagyu, K., M. Takeshita, T. Otsuka, H. Kubota, A. Furuse, and P. J. van Breda Vriesman.** 1994. Reactivation of latent cytomegalovirus in allografts: comparison of lung graft and kidney graft in rats. *Transplant. Proc.* **26**: 2343-2344.
- Yamamoto, T., M. Naito, H. Moriyama, H. Umezue, H. Matsuo, H. Kiwada, and M. Arakawa.** 1996. Repopulation of murine Kupffer cells after intravenous administration of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. *Am. J. Pathol.* **149**: 1271-1286.
- Yamane, A., L. Seetharam, S. Yamaguchi, N. Gotoh, T. Takahashi, G. Neufeld, and M. Shibuya.** 1994. A new communication system between hepatocytes and sinusoidal endothelial cells in liver through vascular endothelial growth factor and Flt tyrosine kinase receptor family (Flt-1 and KDR/FIk-1). *Oncogene* **9**: 2683-2690.
- Yamashita, J., H. Itoh, M. Hirashima, M. Ogawa, S. Nishikawa, T. Yurugi, M. Naito, K. Nakao, and S.-I. Nishikawa.** 2000. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* **408**: 92-96.
- Yang, J., E. Chang, A. M. Cherry, C. D. Bangs, Y. Oei, A. Bodnar, A. Bronstein, C.-P. Chiu, and G. S. Herron.** 1999. Human endothelial cell life extension by telomerase expression. *J. Biol. Chem.* **274**: 26141-26148.
- Yoshida, M., S. Horinouchi, and T. Beppu.** 1995. Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. *Bioessays* **17**: 423-430.
- Yoshida, M., K. Masako, M. Akita, and T. Beppu.** 1990. Potent and specific inhibitor of mammalian histone deacetylase both *in vivo* and *in vitro* by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* **28**: 17174-17179.
- Yow, D. M.** 1989. Congenital cytomegalovirus diseases: a new problem. *J. Infect. Dis.* **159**: 163-167.
- Yu, K. O., and S. A. Porcelli.** 2005. The diverse functions of CD1d-restricted NKT cells and their potential for immunotherapy. *Immunol. Lett.* **100**: 42-55.
- Yuhasz, S. A., V. B. Dissette, M. L. Cook, and J. G. Stevens.** 1994. Murine cytomegalovirus is present in both chronic active and latent states in persistently infected mice. *Virology* **202**: 272-280.
- Zaia, J. A., and S. J. Forman.** 1995. Cytomegalovirus infection in the bone marrow transplant recipient. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* **9**: 879-900.
- Zimmermann, K., D. Schogl, and J. W. Mannhalter.** 1998. Digestion of terminal endonuclease recognition sites on PCR products. *Biotechniques* **4**: 582-584.

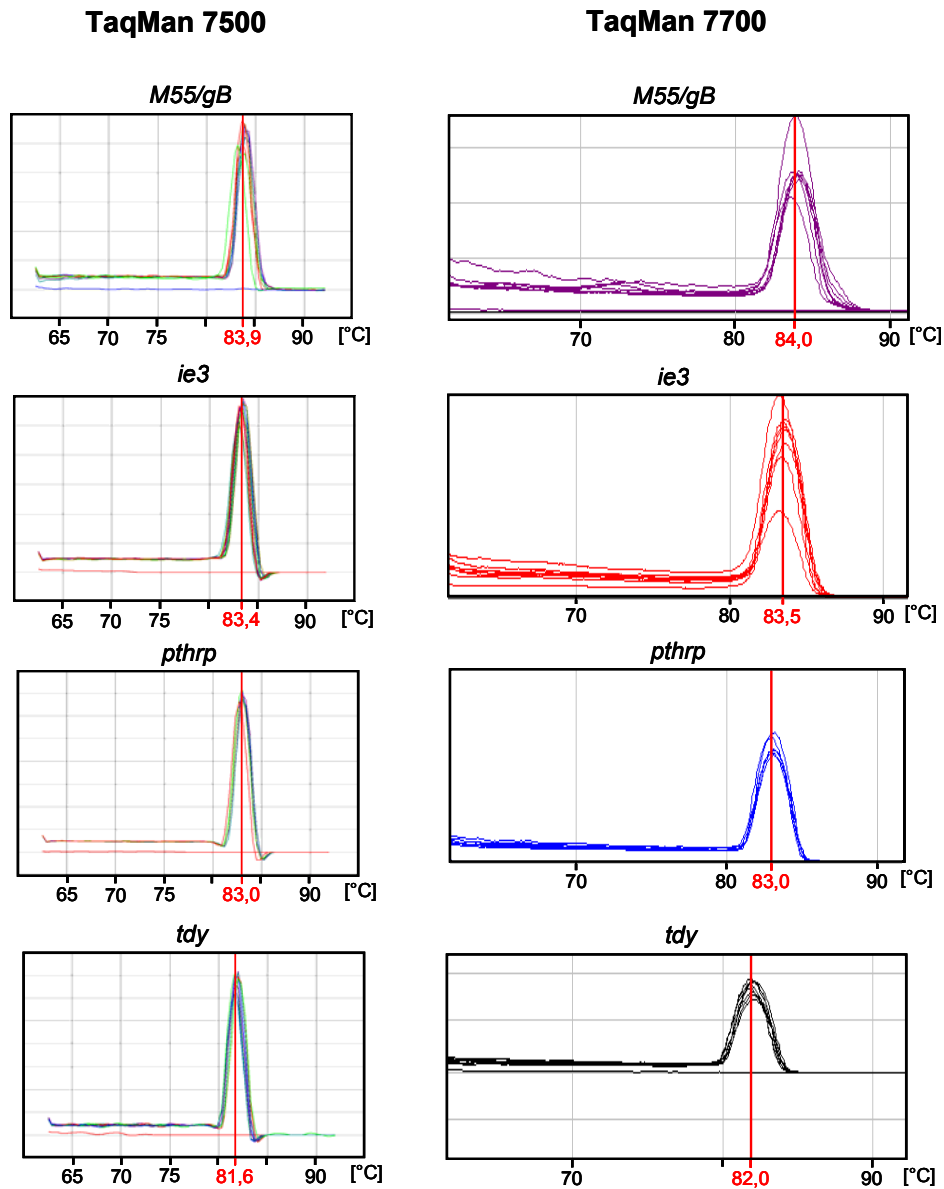
## 6 Anhang

### 6.1





B



**Abb. 6.1 SYBR-Green PCRs für *M55/gB*, *ie3*, *pthrp* und *tdy***

A. Titrationsreihen der mit *Sma* I linearisierten Plasmid-Standarte (pDrive\_gB\_PTHrP\_Tdy und pDrive\_IE3\_PTHrP\_Tdy), welche für den TaqMan 7500 (linke Spalte) und den TaqMan 7700 (rechte Spalte) generiert wurden. *M55/gB* (violett) wurde (markiert durch Exponenten) im TaqMan 7500 von  $10^7$  bis  $10^1$  und im TaqMan 7700 von  $10^5$  bis  $10^1$ , *ie3* (rot) im TaqMan 7500 von  $10^5$  bis 5 und im TaqMan 7700 von  $10^6$  bis  $10^1$ , *pthrp* (blau) von  $10^6$  bis  $10^2$  und *tdy* (schwarz) von  $10^6$  bis  $10^1$  für den TaqMan 7500 bzw. für den TaqMan 7700 von  $10^5$  bis  $10^1$  Plasmide pro Ansatz titriert. Auf der y-Achse ist die normalisierte Fluoreszenzintensität (Rn) aufgetragen, bei welcher die Fluoreszenz des Reporters durch die Fluoreszenz des passiven Referenzfarbstoffs (ROX) dividiert wird. Der  $\Delta Rn$ -Wert bezeichnet die normalisierte relative Fluoreszenzintensität abzüglich des Hintergrundrauschens (*baseline*). Die horizontale Linie (grün für TaqMan 7500, schwarz für TaqMan 7700) stellt den *threshold* dar, wobei die Schnittpunkte des *thresholds* mit den Standardkurven die jeweiligen  $C_T$ -Werte definieren. B. Schmelzdiagramme der spezifischen *M55/gB*, *ie3*, *pthrp* und *tdy* Amplikons. Die Schmelzkurven wurden über einen Bereich von 60°C bis 95°C aufgenommen, um alle unspezifischen Amplifikationen zu detektieren.

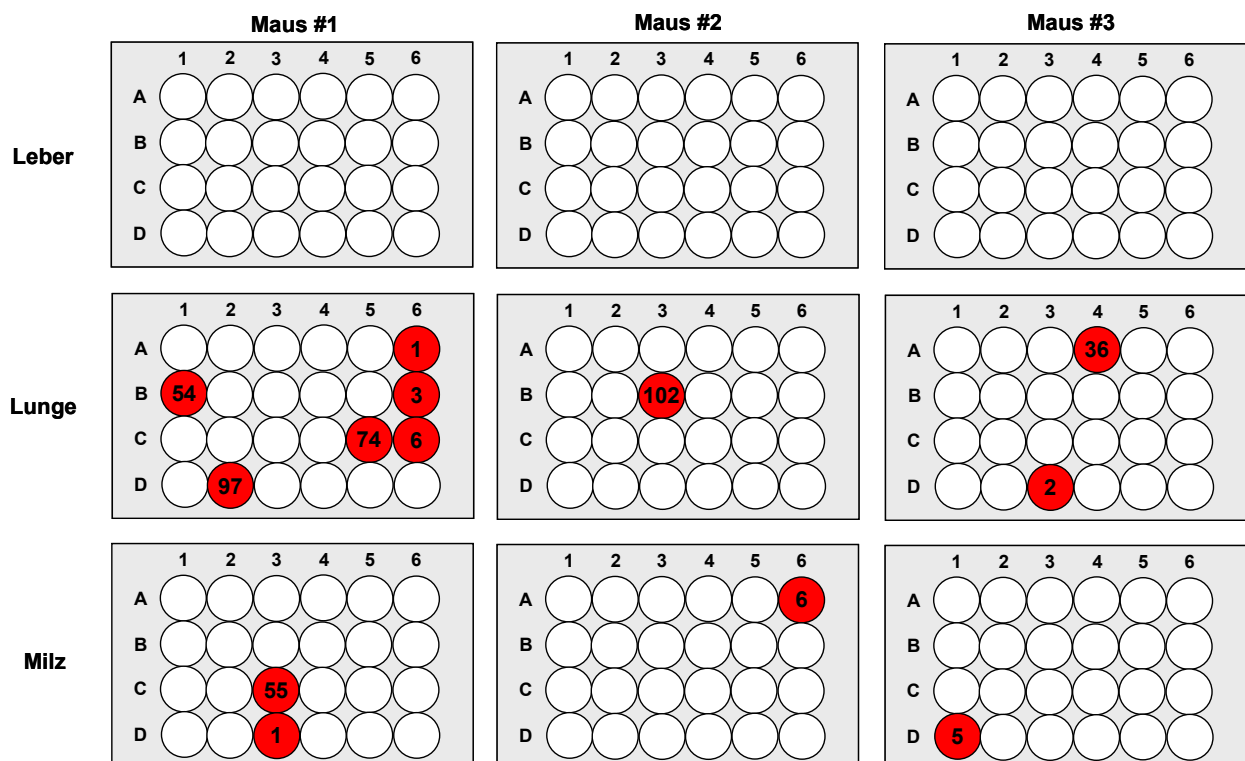
## 6.2

A

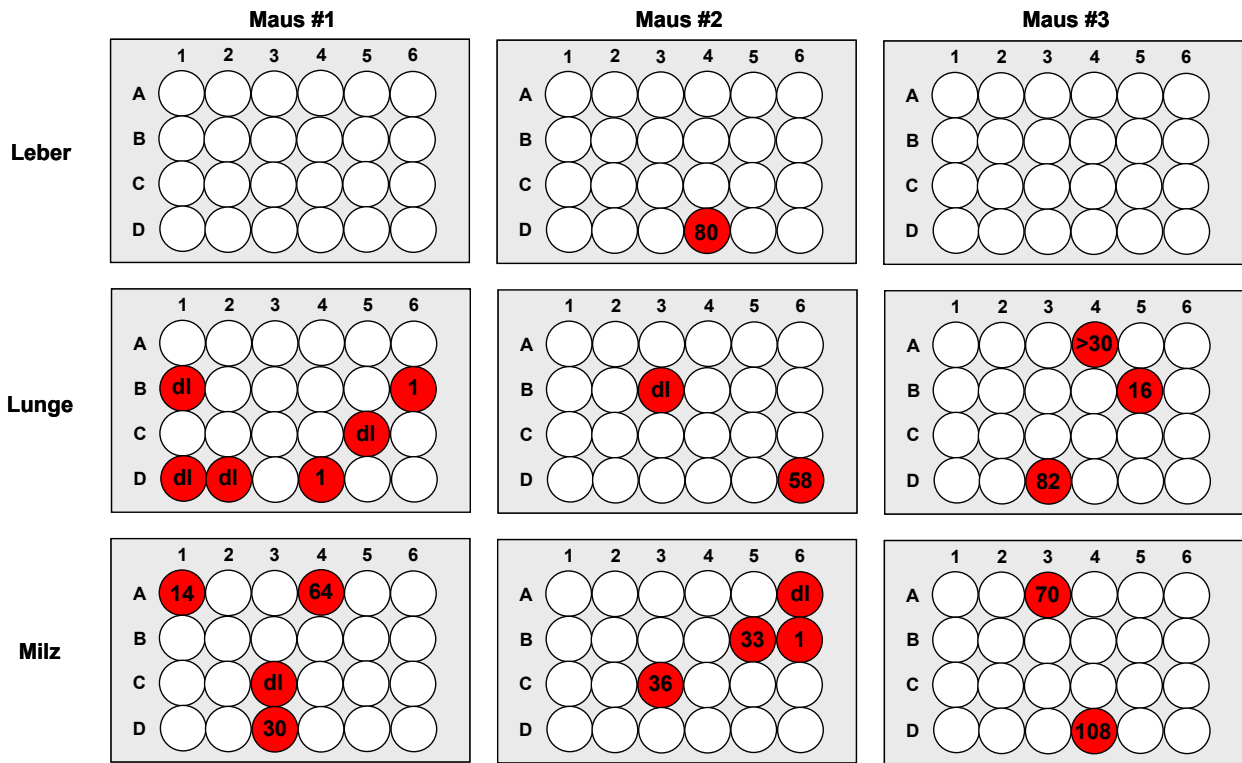
Organ	Woche 1	Woche 1,5	Woche 2	Woche 2,5	Woche 5	Woche 7	Woche 8/9
Maus 1 Leber	0 + / 24 -	0 + / 24 -	3 + / 21 -	3 + / 21 -	3 + / 21 -	4 + / 20 -	4 + / 20 -
Maus 2 Leber	0 + / 24 -	1 + / 24 -	3 + / 21 -	3 + / 21 -	5 + / 19 -	5 + / 19 -	5 + / 19 -
Maus 3 Leber	0 + / 24 -	0 + / 24 -	0 + / 24 -	1 + / 23 -	1 + / 24 -	1 + / 24 -	1 + / 24 -
Maus 1 Lunge	6 + / 18 -	6 + / 18 -	8 + / 16 -	17 + / 7 -	22 + / 2 -	24 + / 0 -	24 + / 0 -
Maus 2 Lunge	1 + / 23 -	2 + / 22 -	2 + / 22 -	3 + / 21 -	7 + / 17 -	24 + / 0 -	24 + / 0 -
Maus 3 Lunge	2 + / 22 -	3 + / 21 -	6 + / 18 -	11 + / 13 -	18 + / 6 -	19 + / 5 -	24 + / 0 -
Maus 1 Milz	2 + / 22 -	4 + / 20 -	6 + / 18 -	8 + / 16 -	8 + / 16 -	9 + / 16 -	9 + / 16 -
Maus 2 Milz	1 + / 23 -	4 + / 20 -	9 + / 15 -	12 + / 12 -	16 + / 8 -	16 + / 8 -	16 + / 8 -
Maus 3 Milz	1 + / 23 -	2 + / 22 -	5 + / 19 -	11 + / 13 -	20 + / 4 -	24 + / 0 -	24 + / 0 -

B

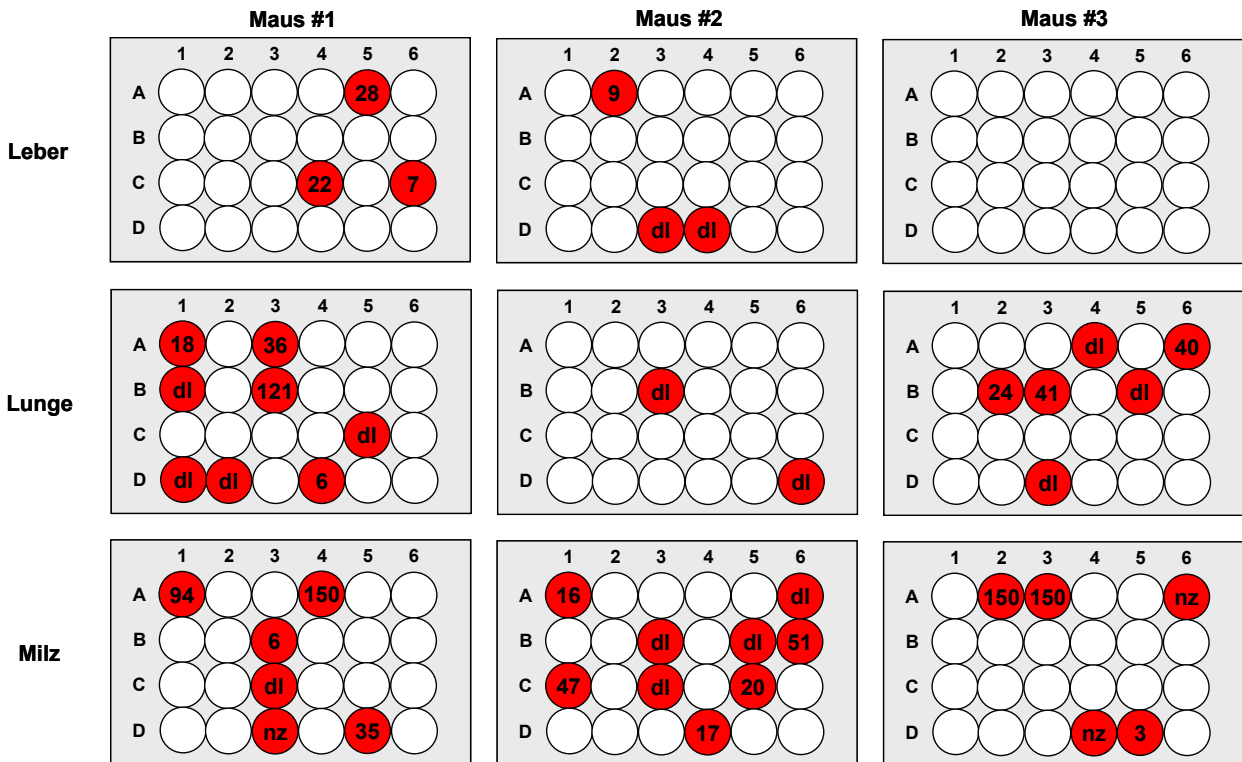
## Woche 1



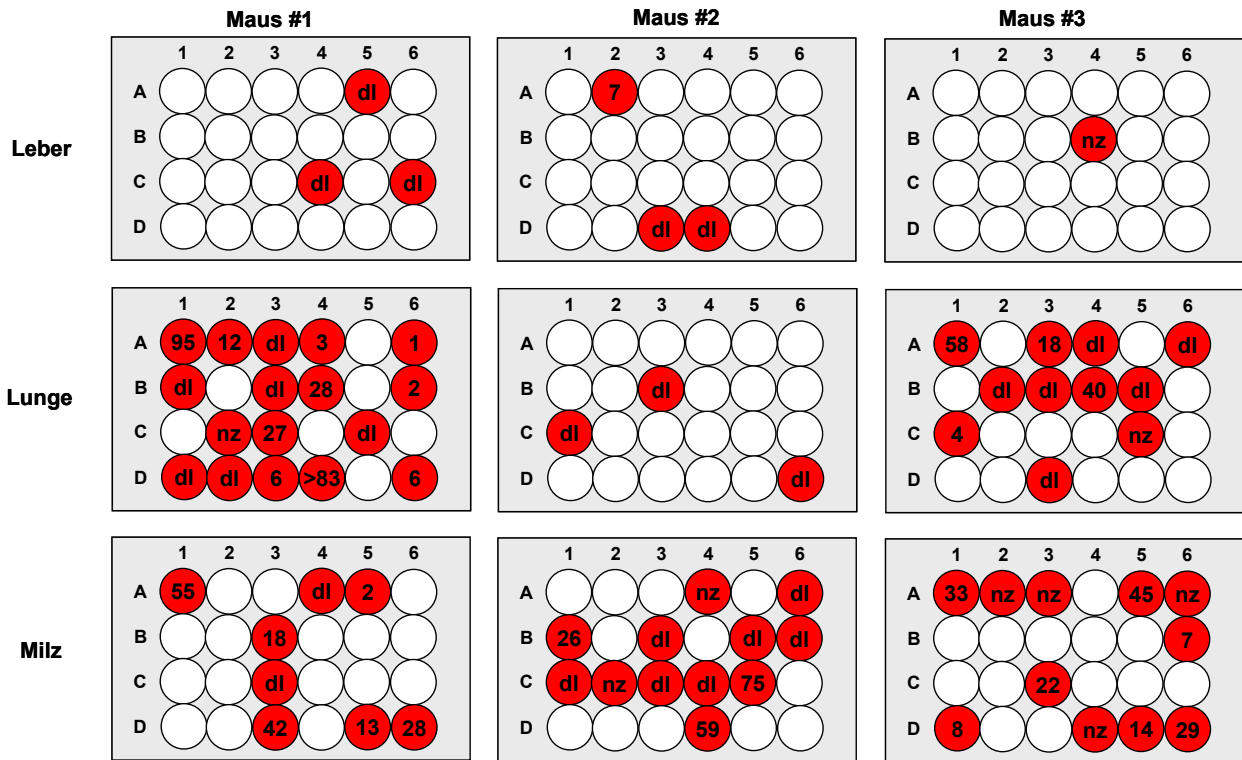
**Woche 1,5**



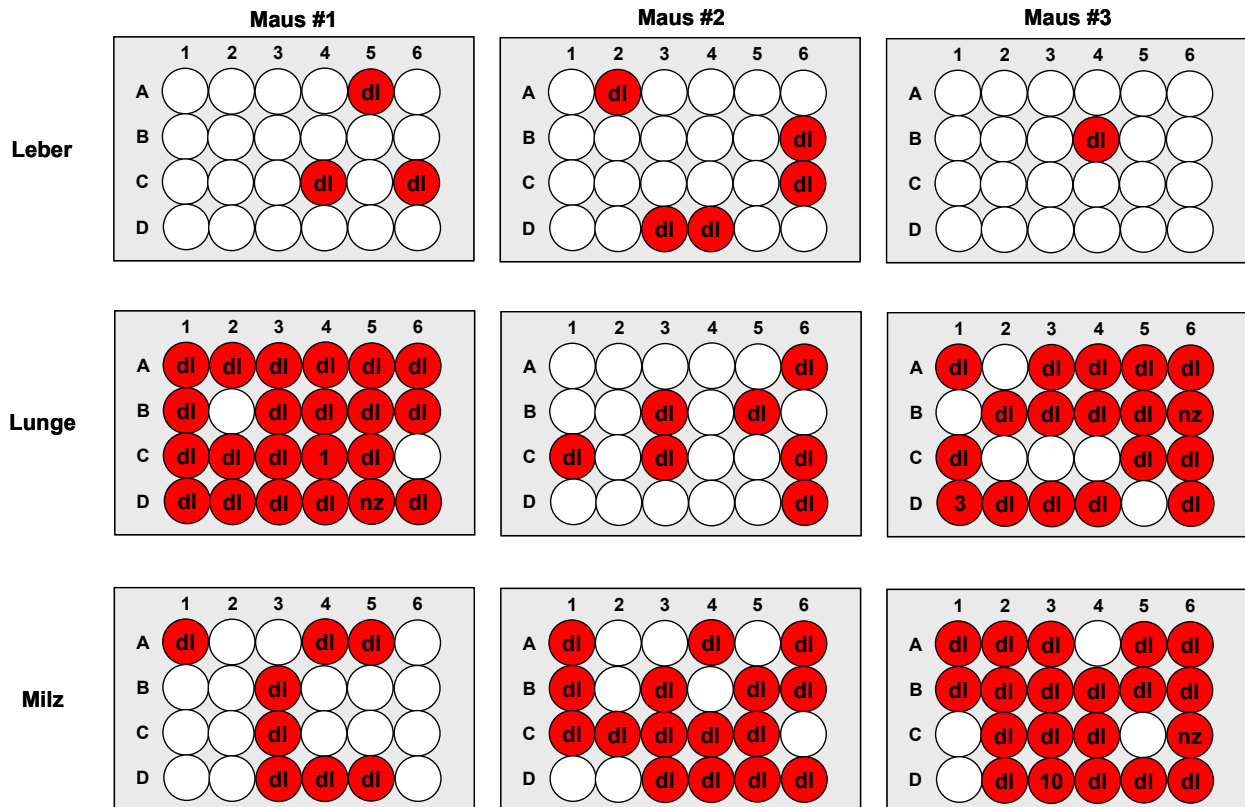
**Woche 2**



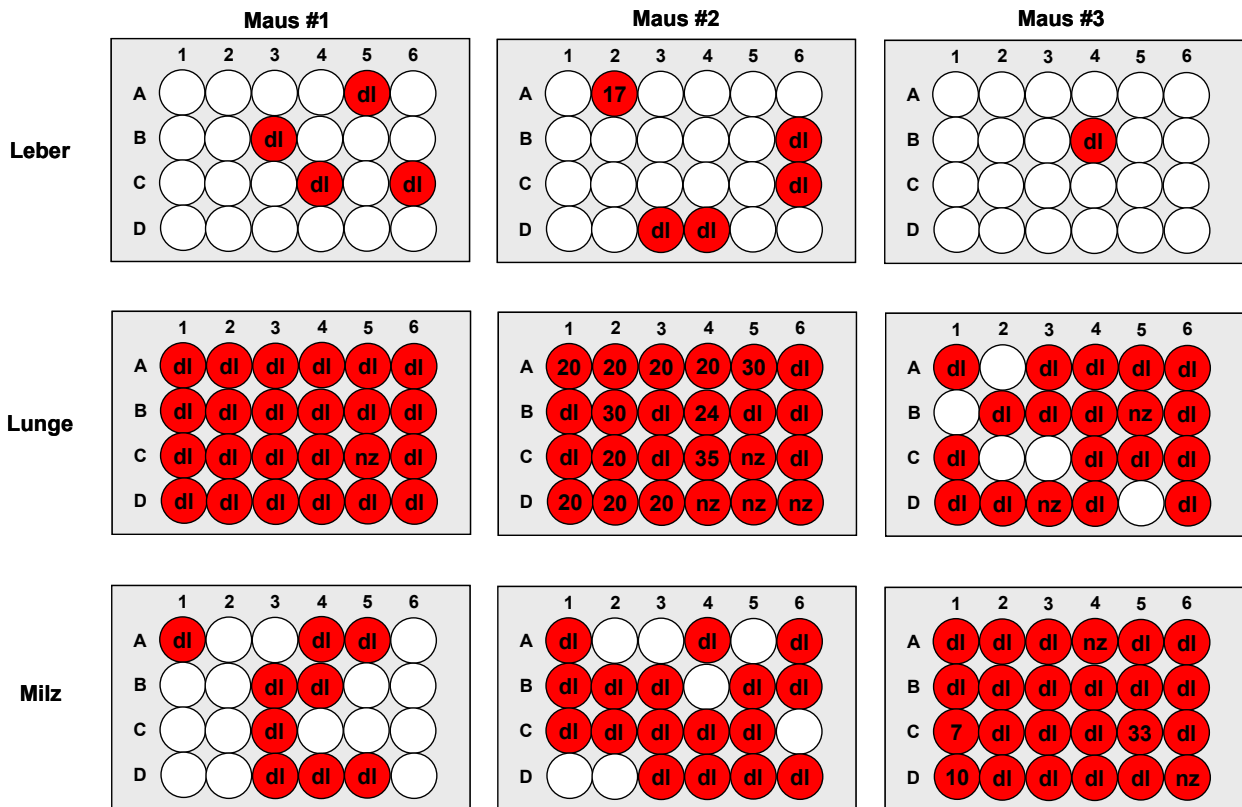
### Woche 2,5



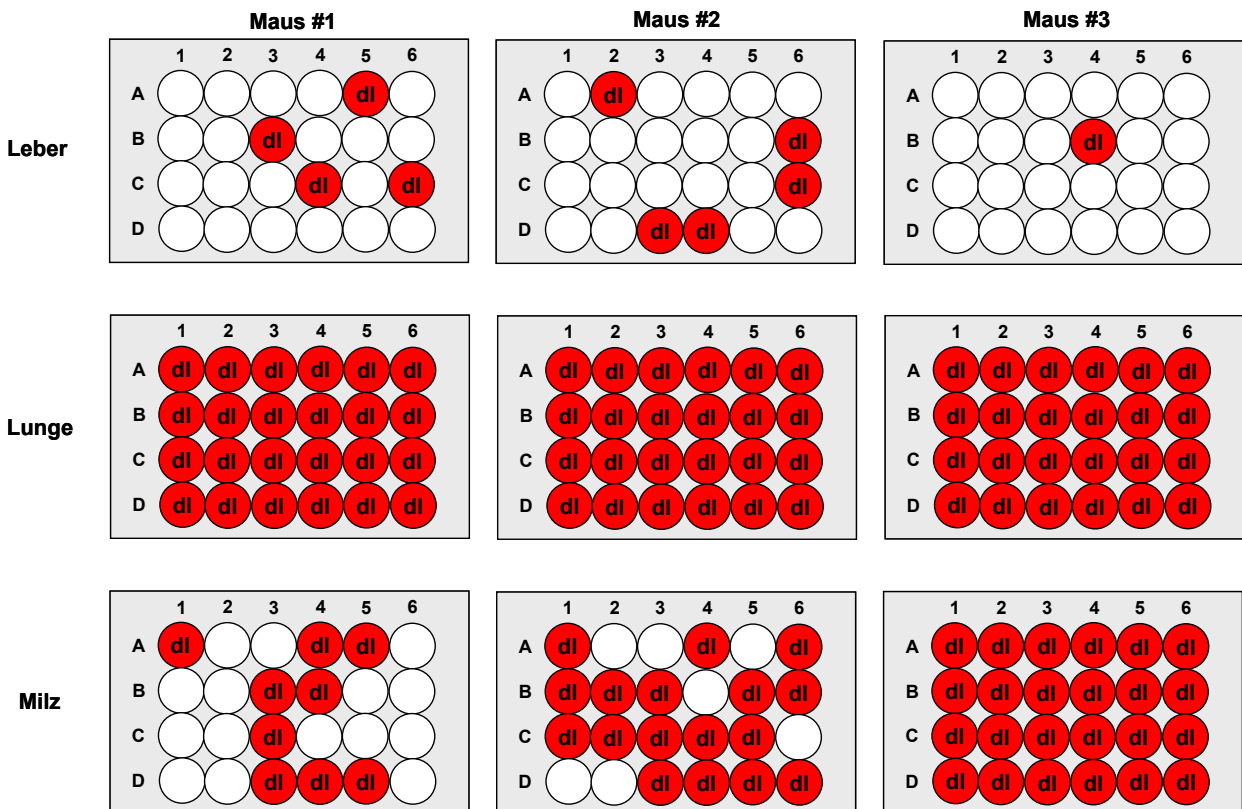
### Woche 5



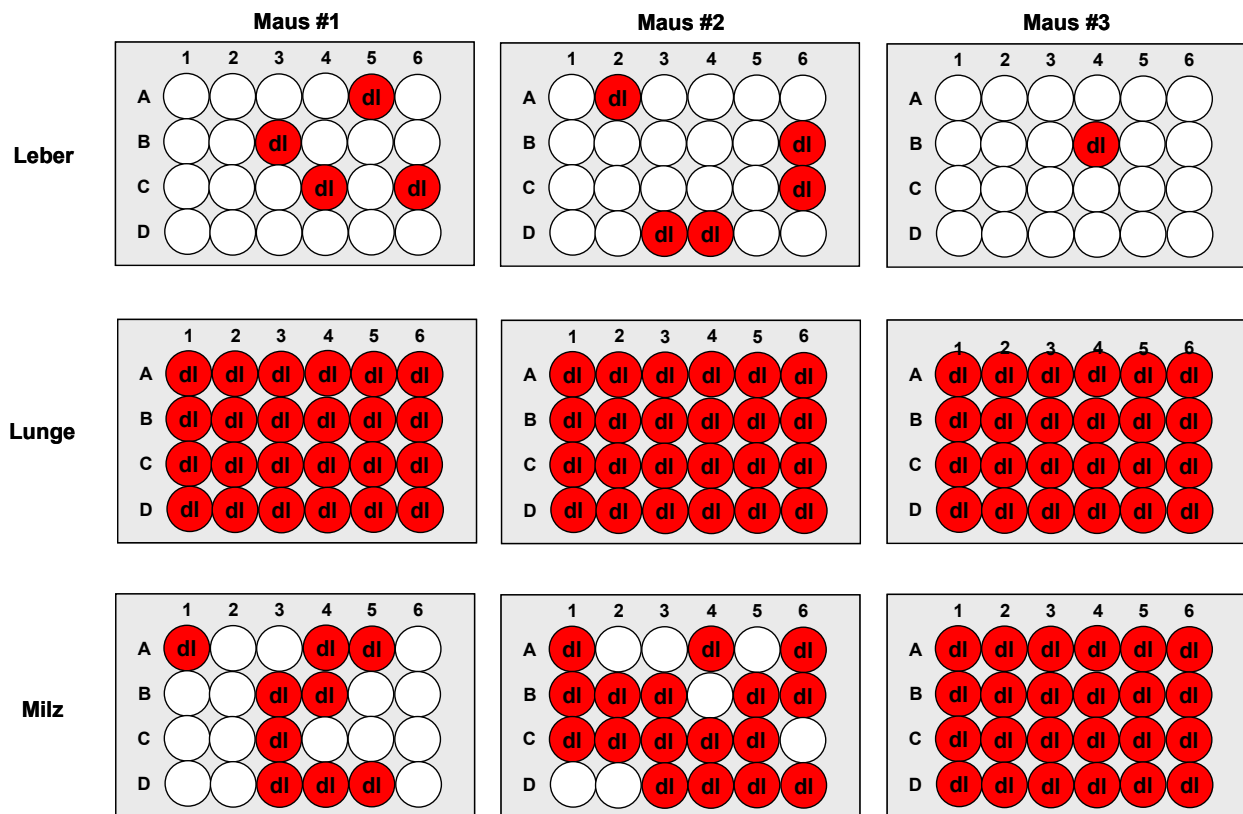
### Woche 7



### Woche 8



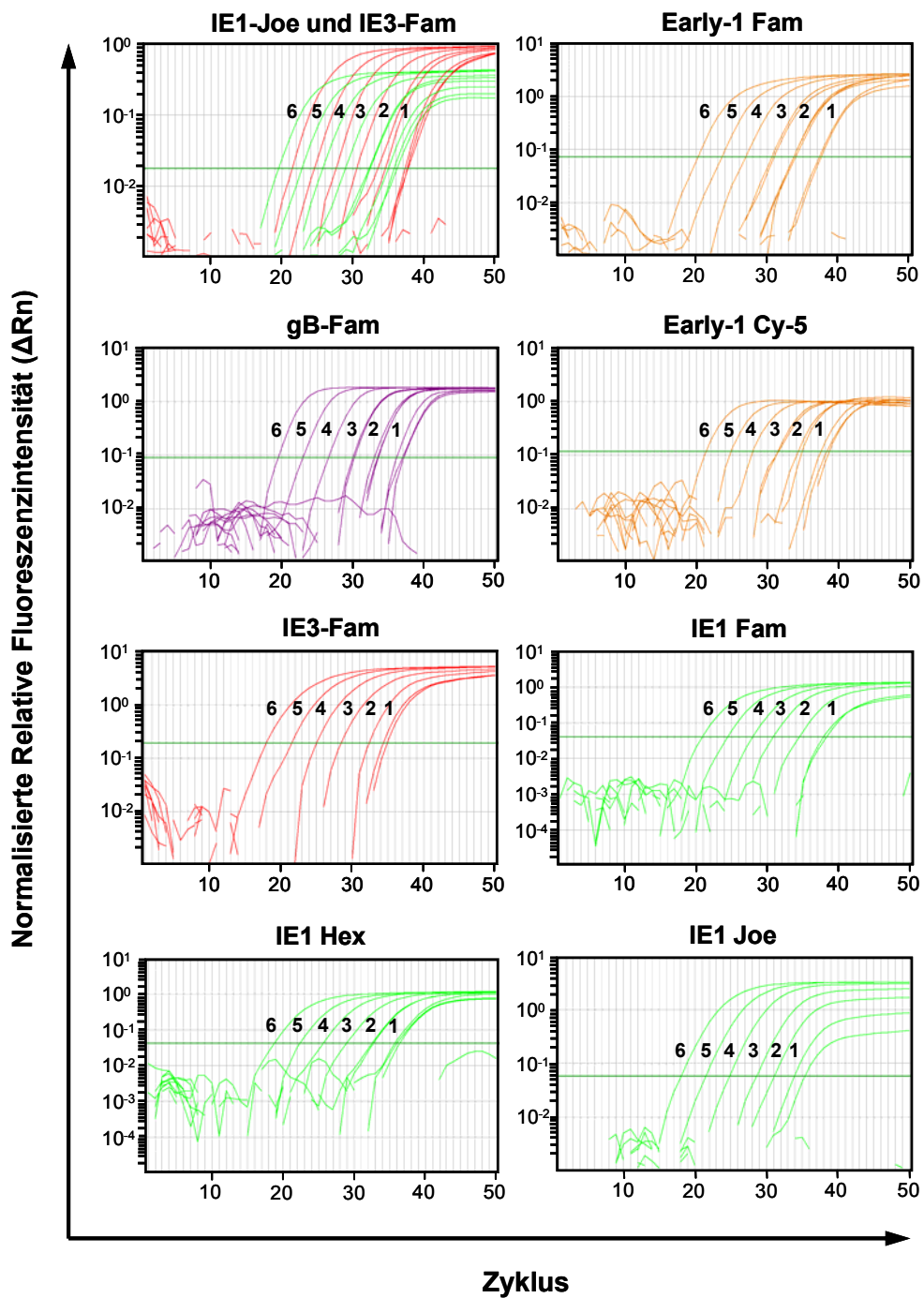
## Woche 9



**Abb. 6.2 mCMV Reaktivierung aus Organexplantaten**

Von drei latent infizierten Mäusen wurden jeweils Milz, Leber und Lunge entnommen. Aus den Organen wurden 24 Stückchen mit einer Kantenlänge von maximal 3mm geschnitten und diese separat in jeweils einer 24-well Platte pro Organ und Tier inkubiert. Nach 1 Woche; 1,5; 2; 2,5; 5; 7; 8 und 9 Wochen wurden pro Ansatz jeweils 300µl Kulturüberstand entnommen und auf MEF gegeben. A. In der Tabelle dargestellt ist die Anzahl der Reaktivierungen pro 24-well Platte für jedes Tier und Organ, wobei die Reaktivierungsereignisse rot gekennzeichnet wurden. B. In den folgenden Abbildungen ist die Verteilung der positiven Ansätze mit der dazugehörigen Anzahl von Plaques dargestellt; nz: nicht zählbare Plaques, dl: durchlysierter Zellrasen.

## 6.3



**Abb. 6.3** Titration der *in vitro* Transkripte für IE1, IE3, gB und Early1

*In vitro* Transkripte für IE1 (grün), IE3 (rot), gB (violett) und Early1 (ocker) wurden von  $10^6$  bis  $10^1$  Transkripte titriert und in die RT-qPCR eingesetzt. Dargestellt sind alle eingesetzten Fluoreszenzen, für IE1 Messungen in Filter 1 (Fam) und Filter 2 (Joe, Hex), für Early1 Messungen in Filter 1 (Fam) und Filter 5 (Cy-5). IE1 und IE3 wurden im Duplex Ansatz quantifiziert, wobei IE1 in Filter 2 (Hex oder Joe) und IE3 in Filter1 (Fam) detektiert wird.

## 7 Veröffentlichungen

Simon, C. O., C. K. Seckert, D. Dreis, M. J. Reddehase, and N. K. A. Grzimek. 2005. Role for tumor necrosis factor alpha in murine cytomegalovirus transcriptional reactivation in latently infected lungs. *J. Virol.* 79: 326-340.

Erlach, K. C., V. Böhm, C. K. Seckert, M. J. Reddehase, and J. Podlech. 2006. Lymphoma cell apoptosis in the liver induced by distant murine cytomegalovirus infection. *J. Virol.* 80: 4801-4819.

Simon, C. O., C. K. Seckert, N. K. A. Grzimek, and M. J. Reddehase. 2006. Murine model of cytomegalovirus latency and reactivation: the silencing/desilencing and immune sensing hypothesis, 483-500. *In* M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.

Reddehase, M. J., C. O. Simon, C. K. Seckert, N. Lemmermann, and N. K. A. Grzimek. 2007. Murine model of cytomegalovirus latency and reactivation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, in press.

## Poster und Vorträge

Grzimek-Koschewa, N. K. A., C. O. Simon, C. K. Seckert, D. Dreis, and M. J. Reddehase. 2003. Role of TNF-alpha in murine cytomegalovirus latency and reactivation in the lungs. 28<sup>th</sup> International Herpesvirus Workshop, Madison.

Seckert, C. K., N. K. A. Grzimek-Koschewa, C. Frenzel, A. Renzaho, and M. J. Reddehase. 2004. Analysis of murine cytomegalovirus latency in the liver. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Tübingen.

Scholz, K., D. Djandji, B. Schumak, R. Zawatzky, U. Kalinke, T. Sacher, C. Seckert, U. Koszinowski, A. Limmer, and P. Knolle. 2005. LSEC contribute as IFN-expressing sentinel cells to early innate antiviral defense but retain their immune-regulatory phenotype. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Kiel.

Erlach, K. C., V. Böhm, C. K. Seckert, M. J. Reddehase, and J. Podlech. 2006. Lymphoma cell apoptosis in the liver after distant murine cytomegalovirus infection independent of virus dissemination. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, München.

Seckert, C. K., A. Renzaho, H.-M. Tervo, M. J. Reddehase, and N. K. A. Grzimek-Koschewa. 2006. Analysis of murine cytomegalovirus latency in the liver. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, München.

Böhm, V., C. O. Simon, R. Holtappels, C. K. Seckert, J. Podlech, and M. J. Reddehase. 2007. In vivo impact of murine cytomegalovirus immunoevasins. 11<sup>th</sup> International CMV Workshop, Toulouse.

Seckert, C. K., A. Renzaho, H.-M. Tervo, M. J. Reddehase, and N. K. A. Grzimek-Koschewa. 2007. Murine cytomegalovirus latency: identification of the latently infected cell type in the liver. 11<sup>th</sup> International CMV Workshop, Toulouse.