

## **B. Material und Methoden**

### **I. Arbeitsmethoden**

#### **I.1 Nabelschnurblut**

##### **I.1.1 Sammlung und Lagerung von Nabelschnurblut (CB)**

Das in Rahmen dieser Arbeit verwendete Nabelschnurblut (*engl.* cord blood, CB) erhielt ich mit freundlicher Unterstützung der Hebammen und Ärzte des St. Joseph Krankenhauses Berlin-Tempelhof und des Krankenhauses des Deutschen Roten Kreuzes Berlin-Charlottenburg. Das Nabelschnurblut wurde direkt nach Abnabelung durch Punktion der Nabelvene termingerechter Geburt gewonnen und bei 4° C in Heparin (10 U/mL) Monovetten gelagert. Blut von HIV, HBV oder HCV positiven Müttern sowie aus Kaiserschnitt-Geburten wurde nicht verwendet, da es dabei zu einer nicht kalkulierbaren Durchmischung des Nabelschnurblutes mit mütterlichem Blut kommen kann. Für die Anzucht von HHV-6B durfte das Blut nicht älter als 24 Stunden, für Transplantationsversuche nicht älter als 6-8 Stunden sein.

##### **I.1.2 Isolierung mononukleärer Zellen aus Nabelschnurblut (CB-MNC)**

Die Gewinnung mononukleärer Zellen aus CB erfolgte durch Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation und wurde nach Standardprotokollen durchgeführt. Dazu wird CB mit Ficoll-Puffer im Verhältnis 1:4 gemischt. Jeweils 35 mL dieser Mischung werden in 50 mL Spitzbodenröhrchen auf 15 mL Ficoll Trennlösung geschichtet. Man zentrifugiert 30 min bei Raumtemperatur (RT) und 400 xg ohne Bremse. Die weiß gefärbte Interphase enthält die mononukleären Zellen und wird mit einer Pasteurpipette abgenommen. Die CB-MNC werden 2x mit 50 mL Ficoll-Puffer gewaschen und jeweils bei 200 xg für 10 min pellettiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt nach Färbung mit Türkscher Lösung in einer Neubauer Kammer.

##### **I.1.3 Anreicherung von CD34<sup>+</sup> Zellen aus CB**

Nabelschnurblut kann 0,1%-2,5% CD34<sup>+</sup> Zellen enthalten. Die Anreicherung dieser Zellfraktion erfolgte durch immunomagnetische Selektion mit dem CD34 Progenitor Cell Isolation Kit der Firma Miltenyi Biotec. Aus frischem CB werden mononukleäre Zellen isoliert und in Portionen à  $1 \times 10^8 / 300 \mu\text{L}$  eiskaltem entgastem MACS-Puffer resuspendiert. Alle folgenden Schritte werden ebenfalls mit eisgekühltem Puffer durchgeführt. Es folgt Inkubation mit 100  $\mu\text{L}$  einer humanen IgG FcR Blockierungsreagenz und gleichzeitig mit 100  $\mu\text{L}$  CD34 spezifischen Maus

mAb für 15 min bei 4° C. Anschließend wird mit 10 mL MACS-Puffer gewaschen und nach Zentrifugation bei 200 xg für 10 min werden die Zellen wieder in 400 µL MACS-Puffer aufgenommen. Man fügt 100 µL Maus-spezifischen Ziegen-mAb hinzu, welche mit kolloidalem super-paramagnetischem Eisen markiert sind. Nach 15 min Inkubation bei 4° C wird erneut gewaschen und die Zellen in 500 µL entgastem MACS-Puffer aufgenommen.

Während des letzten Waschschrilles werden eine Positiv-Selektionssäule und ein Prä-Separationsfilter (zur Trennung von Zellaggregaten) mit 1 mL entgastem MACS-Puffer equilibriert. Die Säule wird in einen Magneten (MACS-Separator) eingespannt und die Zellsuspension durch den Separationsfilter auf die Säule gegeben. Nur bedingt durch die Schwerkraft laufen die Zellen durch die Säule, wobei mit dem Sekundär-Antikörper und dadurch mit kolloidalem Eisen, markierte Zellen im Magnetfeld an die Stahlwolle der Säule binden. Hat die Zellsuspension die Säule passiert, wird 3x mit je 500 µL Puffer gewaschen und die Säule vom Magneten genommen. Außerhalb des Magnetfeldes werden die Zellen jetzt mit Hilfe eines mitgelieferten Schiebers mit 1 mL MACS-Puffer ruckartig von der Säule eluiert. Zur Erlangung höherer Reinheiten kann das Eluat erneut über eine Säule gegeben werden.

## **I.2 Zellkultur**

Die in dieser Arbeit durchgeführten Primären Zellkulturen umfaßten die Stimulation von CB-MNC zum Zweck der HHV-6 Anzucht, die Langzeitkultivierung von CD34<sup>+</sup> Zellen zur Bildung von Endothelzellen, die Kultivierung von HUVEC als Positiv-Kontrolle der Expression von Endothelzell-Markern und die Langzeitkultivierung von Chimären-Knochenmark, zur Stimulierung hämatopoetischer und nicht hämatopoetischer humaner Zellen im Knochenmark chimärer Mäuse.

In permanenter Zellkultur wurden die humanen T-Zelllinien CCRF-HSB-2 und Sup-T1, sowie die embryonale Rattenfibroblasten Zelllinie Rat-1 und die durch Transfektion mit dem humanen IL-3 Gen daraus erhaltene Zelllinie Rat-IL-3 gehalten.

### **I.2.1 Stimulation von CB-MNC**

HHV-6 infiziert bevorzugt proliferierende Lymphozyten. Deshalb können nach 24-48 Stunden mitogener Stimulation von CB-MNC höhere Virustiter in der Kultur erreicht werden. Zu diesem Zweck werden frisch präparierte CB-MNC in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$ /mL in RPMI 1640 mit 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FKS), 100 U/mL Penicillin, 10 µg/mL Streptomycin und 200 mM

Glutamax I aufgenommen. Zur Stimulation werden dem Medium 10 U/mL humanes Interleukin-2 (rhIL-2) und 5 µg/mL PHA zugesetzt und die Zellen bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Feuchtbrutschrank inkubiert.

### **I.2.2 Langzeitkulturen zur Bildung von Endothelzellen aus CD34 Zellen (CD34-LTC)**

Da die Charakterisierung der ausdifferenzierten, adhärennten Zellen nach der Kultivierung zumeist immuncytochemisch erfolgte, wurden die Kulturen in 10 mL Plastikflaschen mit abbrechbarem Boden angesetzt. Dieser kann bei der Färbung wie ein Objektträger behandelt werden. Zur Verbesserung der Adhärenz und zum Schutz der Zellen vor Apoptose, werden die Böden der Kulturflaschen über Nacht mit 0,1% Gelatinelösung oder 10 µg/cm<sup>2</sup> Fibronectin in Beschichtungspuffer bei RT im Dunkeln inkubiert. So beschichtete Flaschen können bis zu einer Woche bei 4° C aufbewahrt werden. Vor der Einsaat der Zellen saugt man den Beschichtungspuffer ab und spült 1x vorsichtig mit PBS. Die zu differenzierenden Zellen werden in 3 mL des entsprechenden Mediums eingesät und man inkubiert bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Feuchtbrutschrank. Nach einer Woche erfolgt Fütterung durch Austausch von 1,5 mL Medium, wobei im Überstand befindliche Zellen so vollständig wie möglich abgenommen werden. In der 3. Woche werden jeweils 2 mL Medium ausgetauscht. Insgesamt wurden 4 verschiedene Medien getestet (EWM1-EWM4). In einzelnen Versuchen wurden CB-MNC und als Kontrolle der Durchlauf der MACS Anreicherung von CD34<sup>+</sup> Zellen, also eine CD34<sup>+</sup> abgereicherte Zellfraktion, eingesät. Dabei wurden je 1-3x10<sup>6</sup> Zellen eingesetzt. In der Regel wurden jedoch 2-5x10<sup>5</sup> CD34<sup>+</sup> Zellen mit einer Reinheit von <85% verwendet.

### **I.2.3 Kultivierung von HUVEC**

Aus der Nabelschnur frisch isolierte HUVEC werden in einer Konzentration von 2-3x10<sup>7</sup>/mL in 10 mL HUVEC-Medium eingesät. Alle 3-4 Tage erfolgt Mediumwechsel. Zur erhöhten Expression von Endothelzell-Markern können die Zellen mit 1% RDGF (*engl.* Retina derived growth factor) stimuliert werden. Wenn die Zellen zu einem konfluenten Rasen herangewachsen sind, werden sie immuncytochemisch gefärbt oder mit Hilfe eines Schabers vom Boden der Kulturflasche abgelöst und sofort für die RNA Präparation verwendet.

### **I.2.4 Langzeitkulturen von Chimären-Knochenmark**

1x10<sup>6</sup> frisch entnommene Knochenmarkzellen aus dem Femurschaft einer chimären Maus oder nicht transplantierten Kontrollmaus werden in 3 mL Myelocult/IL-3 in Plastikflaschen mit abbrechbarem Boden eingesät. Die Zellen werden nach einer

Woche das erste Mal durch  $\frac{1}{2}$  Mediumwechsel mit Myelocult/IL-3 gefüttert. Nach weiteren 3-4 Tagen werden  $\frac{3}{4}$  des Mediums ausgetauscht, wobei jetzt Myelocult/IL-3 und BM-IMDM im Verhältnis 1:1 gemischt werden. Alle 3-4 Tage wird dann durch  $\frac{3}{4}$  Mediaustausch mit BM-IMDM gefüttert. Dabei werden in Suspension befindliche Zellen so vollständig wie möglich entfernt. Hat sich ein konfluenter Zellrasen gebildet, werden die Zellen immunocytochemisch charakterisiert oder zur DNA Präparation mit einem Schaber abgelöst.

### **I.2.5 Kultivierung von T-Zelllinien**

Zur Anzucht der HHV-6 Variante A wurden die T-Zelllinien CCRF-HSB-2 und Sup-T1 in permanenter Zellkultur gehalten. Beide Zelllinien werden in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen/mL in 10 mL RPMI 1640 mit 10% FKS, 100 U/mL Penicillin, 100  $\mu$ g/mL Streptomycin und 200 mM Glutamax I bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Feuchtbrutschrank inkubiert. Alle 3 Tage erfolgt ein vollständiger Mediaustausch. Erreicht die Zellkonzentration  $1 \times 10^6$ /mL werden die Zellen umgesetzt.

### **I.2.6 Kultivierung von Rat-1 und Rat-IL3**

Rat-1 Zellen sind embryonale Rattenfibroblasten. Durch Transfektion mit dem humanen IL-3 Gen können diese als Ko-Transplantat in Mäusen zu einer kontinuierlichen Produktion von humanem IL-3 (Rat-IL-3) in der Maus eingesetzt werden. Zur Vermehrung werden Rat-1 oder Rat-IL-3 Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$ /mL in 10 mL DMEM in 50 mL Kulturflaschen eingesät. Alle 3-4 Tage erfolgt die Passage durch 5 min Inkubation mit Trypsin bei 37° C und erneutes Einsäen. Der Kulturüberstand einer konfluente Rat-IL-3 Kultur enthält ~200 ng/mL humanes IL-3 (KÜS-IL-3).  $1 \times 10^7$  Rat-1 oder Rat-IL-3 Zellen werden als Ko-Transplantat in NOD/SCID Mäusen verwendet.

### **I.3 Kultivierung von HHV-6**

In dieser Arbeit wurde mit den HHV-6A Stämmen U1102 und St.W., sowie dem HHV-6B Stamm R104 gearbeitet. Die Stämme U1102 und R104 wurden uns von Dr. Frank Neipel aus der Arbeitsgruppe von Prof. B. Fleckenstein, Institut für Virologie-Erlangen, zur Verfügung gestellt, der Stamm St.W. von Prof. G. Pauli, Robert Koch-Institut.

Während HHV-6A Stämme gut auf T-Zelllinien vermehrt werden können, verwendet man für HHV-6B frisch stimulierte Lymphozytenkulturen. Die Infektionsprotokolle für beide Varianten sind dabei identisch (Frenkel, 1990).

### **I.3.1 Infektion von Zelle zu Zelle**

Die zu infizierenden Zellen werden in einem Volumen von 1-2 mL RPMI 1640 mit infizierten Zellen im Verhältnis 5:1 gemischt und 2 h bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Alternativ können die Zellen bei 37° C und 200 xg für 40 min zentrifugiert werden, wodurch die Infektion etwas effizienter wird. Anschließend werden die Zellen in 10 mL RPMI 1640 mit 10% FKS, 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin und 200 mM Glutamax I resuspendiert und bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Feuchtbrutschrank inkubiert. Alle 3-4 Tage wird das Medium zur Hälfte ausgetauscht.

### **I.3.2 Infektion mit zellfreien Kulturüberständen**

Will man nicht bereits infizierte Zellen in die Kultur tragen, resuspendiert man die zu infizierenden Zellen in zellfreiem Kulturüberstand stark HHV-6 infizierter Zellkulturen. Richtlinie für eine effiziente Infektion ist die Suspension von  $1 \times 10^6$  Zellen in 1 mL Kulturüberstand. Auf diese Weise infizierte Zellen sind nach 5-8 Tagen zu 50-80% infiziert, abhängig vom Virustiter des zur Infektion verwendeten Kulturüberstandes.

### **I.3.3 Virustitration**

Für gewöhnlich wird zur Bestimmung des Titers einer Viruslösung der CPE serieller Verdünnungen auf adhärent wachsenden Zellen bestimmt. Daraus läßt sich dann die TCID<sub>50</sub> (*engl.* tissue culture infectious dose 50) berechnen. Daß HHV-6B am effizientesten CB-MNC infiziert, macht eine Beurteilung des CPE in dieser heterogenen, in Suspension wachsenden Zellpopulation sehr schwierig. Deshalb ist für HHV-6 als Ersatzmarker die "Antigen Bildende Einheit" (*engl.* antigen forming unit, AFU) definiert worden (Yoshida, 1996). Dazu wird HHV-6 Antigen in infizierten Zellen mit dem IFA nachgewiesen und vorausgesetzt, daß eine Korrelation zwischen der Anzahl infizierter Zellen in der Kultur und der Anzahl von Viren im Kulturüberstand besteht. 80% HHV-6B infizierter CB-MNC oder HHV-6A infizierter HSB-2 Zellen entsprechen einer TCID<sub>50</sub> von  $10^3$ /mL. Diese Methode kann nur als Näherung betrachtet werden.

### **I.3.4 Virus-Inaktivierung**

Zur Hitze-Inaktivierung der Viren werden zellfreie HHV-6-haltige Kultur-Überstände in einem sterilen Gefäß 60 min bei 56 °C inkubiert. Die UV-Inaktivierung erfolgte durch Bestrahlung in einem Strata-Linker mit 2 J in einer Kulturschale. Dabei wurde das Volumen so gewählt, daß ein möglichst dünner Flüssigkeitsfilm bestrahlt wurde.

### I.3.5 Virusstocks

Zur längeren Lagerung von HHV-6 Kulturen werden  $1 \times 10^7$  infizierte Zellen pro mL RPMI 1640 mit 10% DMSO und 20% FKS vital mit einem Einfriergerät oder einer Gefrierbox eingefroren. Sie werden in flüssigem Stickstoff oder bei  $-80^\circ \text{C}$  gelagert. Alternativ können Zellsuspension infizierter Zellen in Kulturüberstand oder zellfreier Kulturüberstand ohne Zusatz von Gefrierschutzmitteln bei  $-80^\circ \text{C}$  gelagert werden. Durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Zellsuspension kann der HHV-6 Titer erhöht werden.

### I.3.6 Nachweis von Mykoplasmen

Zur Kontrolle wurden die Zellkulturen regelmäßig nach Mykoplasmen untersucht. Dazu wurde ein PCR Test aus der Literatur verwendet (van Kuppeveld, 1994).

**Tabelle 7: PCR-Primer und Protokoll für den Mykoplasmen-Nachweis. Die Genom-lokalisierung bezieht sich auf die 16S-rRNA von *Mycoplasma faucium* (Acc. # AF125590)**

Primer	Sequenz 5' 3'	Genomlokalisierung
Myko 1	GGG AGC CAG GAT TAG ATA CCC T	970-996
Myko 2	TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC	732-753

Test-Zusammensetzung			Temperaturprofil			
Probe	5,0 µL					
Primer je	250,0 nM		600 s	bei	94 °C	
dNTPs je	250,0 µM					
10x PCR-Puffer	5,0 µL		45 s	bei	94 °C	
MgCl <sub>2</sub> (50 µM)	1,5 µL		60 s	bei	55 °C	<b>40x</b>
Taq Polymerase	1,0 U		60 s	bei	72 °C	
Aqua bidest ad	50,0 µL					

## I.4 Nukleinsäure-Techniken

### I.4.1 Isolierung von DNA und RNA

Zur Isolierung von DNA aus Kulturzellen, Mauszellen und Mausorganen wurde der Blood Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. Kulturzellen, Blutzellen und Knochenmarkzellen wurden nach dem Protokoll für Blut, Mausorgane nach dem Protokoll für Gewebe präpariert. Es wurde mit 100 µL Wasser eluiert und wenn nötig die DNA Konzentration photometrisch bei 260 nm bestimmt. Die DNA wurde bei  $-20^\circ \text{C}$  gelagert.

Die RNA Isolierung erfolgte mit dem RNeasy Kit von Qiagen. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Um DNA-freie RNA zu erhalten, wurde ein zusätzlicher DNA-Verdau mit dem dafür vorgesehenen Qiagen Kit durchgeführt. Zur

Kontrolle wurde die RNA als Matrize in eine PCR zum Nachweis von  $\beta$ -Aktin eingesetzt, die spezifisch genomische DNA amplifiziert. Wenn es bei dieser PCR zu einer Produktbildung kam, wurde die RNA erneut einem DNA Verdau unterzogen. RNA wurde mit 50  $\mu$ L DEPC-H<sub>2</sub>O eluiert und bei  $-80^{\circ}$  C bis zur Verwendung gelagert.

#### I.4.2 Reverse Transkription (RT) und PCR

Zwei verschiedene Ansätze der Reversen Transkription wurden durchgeführt. Bei der 2-Schritt-RT-PCR wird zuerst mit Hexanukleotiden zufälliger Sequenz (random Hexamers) die gesamte RNA mit Reverser Transkriptase, z.B. MMLV RT, in cDNA umgeschrieben und anschließend in einer konventionellen PCR mit gen-spezifischen Primern als Matrize eingesetzt. Bei der 1-Schritt RT-PCR wird die Reverse Transkription und die PCR mit gen-spezifischen Primern und einem Enzym, der Tth Polymerase, direkt hintereinander durchführt. Diese Polymerase ist in Gegenwart von Mangan<sup>2+</sup>-Ionen sowohl zur Reversen Transkription als auch zur PCR in der Lage.

Bei der 2 Schritt RT wird der Reaktionsmix auf Eis pipettiert, die RNA darin denaturiert und erst dann RNase-Inhibitor (RNAsin) und die Reverse Transkriptase dazugeben. Nach diesem Protokoll dauert die RT-Reaktion ~70 min.

**Tabelle 8: Reaktionsansatz für die Reverse Transkription in der 2-Schritt RT-PCR**

Test-Zusammensetzung		Temperaturprofil		
1,0 $\mu$ g RNA	2,0 $\mu$ L	180 s	bei	72 $^{\circ}$ C
Random Hexamer	10,0 $\mu$ M	180 s	auf Eis	
DTT	100,0 $\mu$ M			
dNTPs je	2,2 $\mu$ M			
10 x PCR-Puffer	2,0 $\mu$ L			
Aqua bidest ad	18,5 $\mu$ L	10 min	bei	RT
MMLV RT	1,0 U	>40 min	bei	42 $^{\circ}$ C
RNAsin	1,0 U	5 min	bei	83 $^{\circ}$ C

Für die 1-Schritt RT-PCR werden alle Reaktionsansätze auf Eis pipettiert. Nach Denaturierung der Primer erfolgt eine 30 min Reverse Transkription, direkt gefolgt von der PCR Reaktion.

**Tabelle 9: 1-Schritt RT-PCR Reaktionsansatz**

Test-Zusammensetzung		Temperaturprofil		
0,1-1,0µg RNA	2,0 µL	120 s	bei	50 °C
Primer je	300,0 nM	30 min	bei	60 °C
TaqMan Probe je	150,0 nM	5 min	bei	95 °C
dNTPs je	75,0 µM	20 s	bei	94° C
10x Tth-Puffer (ROX)	3,0 µL	40 s	bei	62° C
Tth Polymerase	2,5 U			<b>45x*</b>
Aqua bidest ad	30,0 µL			

\*Die Annealing-Temperatur muß an die Schmelztemperatur der Primer angepaßt werden

## I.5 HHV-6 Nachweismethoden

Zum Nachweis von HHV-6 wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Methoden etabliert. Diese umfassen den Nachweis von HHV-6 Proteinen mit monoklonalen Antikörpern (mAb) sowie den Nachweis von HHV-6 DNA und RNA.

### I.5.1 Nachweis von HHV-6 Proteinen

Zum Nachweis von HHV-6 Proteinen standen mir 10 HHV-6 spezifische monoklonale Antikörper (mAb) zur Verfügung. Sieben dieser mAb erhielt ich von Prof. J. Luka, Eastern Virginia Medical School, USA, die restlichen waren kommerziell erhältlich. Die Detektion dieser Antikörper erfolgte durch verschiedene indirekte Nachweismethoden.

#### I.5.1.1 Immunfluoreszenz-Assay (IFA)

Beim IFA werden die gebundenen mAb mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten spezies-spezifischen Sekundär-Antikörper markiert und dann im Fluoreszenzmikroskop detektiert.  $1 \times 10^5$  der zu untersuchenden Zellen werden auf einen Objektträger mit 10-Loch Teflonmaske aufgetropft. Dieser wird vorher zur Entfettung abgeflammt und 30 min mit 0,1% Poly-L-Lysin Lösung inkubiert, um die Haftung der

**Tabelle 10: mAb zum Nachweis von HHV-6**

mAb	Antigen
<b>H-AR-2</b>	gp60/110 Membran Antigen
<b>H-AR-6</b>	gp60/110 Membran Antigen
<b>H-AR-9</b>	gp200 Membran Antigen
<b>H-IG-20</b>	p140 Virus Kapsid Antigen
<b>H-Pol-10</b>	DNA Polymerase
<b>H-WL-5</b>	p37 Sehr frühes Antigen
<b>H-WL-8</b>	Spätes cytoplasmatisches Antigen
<b>gp60/110</b>	gp60/110 Membran Antigen
<b>p41</b>	p41 Frühes Antigen, nur HHV-6A
<b>gp106</b>	gp106 Membran Antigen

Zellen an den Objektträger zu verbessern. Nach dem Auftropfen werden die Zellen

bei 37° C getrocknet. Man fixiert 10 min in eiskaltem Aceton und tropft 10 µL der mAb-Lösung auf. Alternativ kann mit Aceton/Methanol 1:1 oder 0,1% Formaldehyd in PBS fixiert werden. Anschließend inkubiert man 30 min bei 37° C in einer feuchten Kammer, wäscht 3x 5 min in PBS und 1x 1 min in H<sub>2</sub>O dest. Das Präparat wird bei 37° C oder durch vorsichtiges Fönen getrocknet. Man tropft 10 µL des Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundär-Antikörpers in einer Konzentration von 10 µg/mL auf und inkubiert erneut 30 min bei 37° C in einer feuchten Kammer im Dunkeln. Es wird gewaschen wie oben beschrieben, das Präparat mit Anti-fade Medium eingedeckt und bis zur Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 4° C im Dunkeln aufbewahrt.

### **I.5.1.2 APAAP (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase)**

Die APAAP Reaktion erlaubt einen sensitiveren Nachweis als der IFA, da es hier zu einer Signalverstärkung kommt. Da bei der APAAP Färbung eine anschließende Beurteilung der Morphologie der Zelle leichter möglich ist als beim IFA, wurden APAAP Färbungen an Cytozentrifugen-Präparaten durchgeführt. Der Vorteil von Cytozentrifugen-Präparaten ist eine sehr gleichmäßige Verteilung der Zellen, die dadurch in einer Schicht auf dem Objektträger liegen. 1-2x10<sup>5</sup> der zu untersuchenden Zellen werden in 200 µL Puffer A resuspendiert und in speziell für diesen Zweck konstruierte Trichter pipettiert. Dabei sollten im Trichter keine Luftblasen entstehen. Dieser Trichter ist bereits mit Hilfe einer Klammer auf einen Objektträger gespannt, nur getrennt durch ein Filterpapier. Diese Konstruktion kann nun in den Rotor einer Cytozentrifuge gestellt und bei geringer Umdrehungszahl (800 rpm, 5 min) zentrifugiert werden. Dabei werden die Zellen in einem definierten Punkt von 6 mm Durchmesser auf den Objektträger zentrifugiert. Die so angelegten Cytopräparate werden über Nacht bei RT oder bei 37° C getrocknet und in eiskaltem Aceton fixiert. Sie können bei -20° C trocken gelagert werden.

Zur Färbung werden die Präparate 20 min bei RT in APAAP-Blockierungspuffer inkubiert. Anschließend wird nacheinander mit HHV-6 mAb, Brücken-Antikörper und APAAP-Komplex für 30 min bei RT inkubiert. Zwischen den Antikörper-Inkubationen wird je 3x 5 min mit APAAP-Waschpuffer gewaschen. Zur Verstärkung kann die Inkubation mit Brücken-Antikörper und APAAP-Komplex für 10 min wiederholt werden, wobei 2x 5 min gewaschen wird. Es folgt eine 30 min Inkubation mit APAAP-Färbelösung in Gegenwart von Levamisol als Inhibitor endogener Phosphatasen. Wieder wird gewaschen und 60 s zur Gegenfärbung mit Mayers saurer Hämalaun-Lösung gefärbt. Die Präparate werden 15 min unter fließendem Wasser gewaschen, getrocknet und mit Glycerin-Gelatine eingedeckt. Unter dem Lichtmikroskop erscheinen APAAP positive Zellen deutlich rot.

Die APAAP Färbung kann in Färbekassetten durchgeführt werden, wobei die Cytopräparate in sogenannte Cover-Slips eingespannt werden. Dadurch bildet sich ein Flüssigkeitsfilm von ~20  $\mu\text{L}$ , der eine gleichmäßige Benetzung der Zellen gewährleistet und diese vor dem Austrocknen schützt. Obwohl diese Methode eine erhöhte Reproduzierbarkeit durch standardisiertere Bedingungen erlaubt, benötigt man größere Volumina der Antikörperlösungen.

#### **I.5.1.3 TYR-Signalverstärkung**

Eine zusätzliche Signalverstärkung bietet die sogenannte Tyramid-Methode. Hierbei werden an den Primär-Antikörper sukzessive ein biotinylierter Sekundär-Antikörper und ein Streptavidin-Biotin Peroxidase-Komplex gebunden. Durch diesen Komplex wird die Präzipitation eines biotinylierten Phenolderivats, des Tyramids, in unmittelbarer Nähe des gebundenen Primär-Antikörpers katalysiert, was zu einer Erhöhung der Anzahl der Biotin-Moleküle und so zu einer Signalverstärkung führt. Diese werden mit Streptavidin-Peroxidase markiert und schließlich mit Diaminobenzidin/ $\text{H}_2\text{O}_2$  Lösung gefärbt. Antigen-positive Zellen erhalten eine braune Färbung. Für die TYR-Signalverstärkung wurde der CSA-Kit von DAKO verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren.

#### **I.5.1.4 Antikörper-Sättigung**

Zum Nachweis der HHV-6 Spezifität des mAb H-AR-2 wurde dieser mit Protein-Rohextrakten HHV-6 infizierter und nicht infizierter CCRF-HSB-2 Zellen gesättigt. Dazu werden die Zellen nach Standardprotokollen infiziert und mit dem IFA der Anteil infizierter Zellen in der Kultur bestimmt. Wenn mehr als 80% der Zellen HHV-6 Antigen positiv sind, werden  $1 \times 10^8$  Zellen in 200  $\mu\text{L}$  PBS mit 1mM EDTA und 1 mM Phenylmethylsulfonsäurefluorid (PMSF) resuspendiert, 3 x in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37° C wieder aufgetaut. 50  $\mu\text{L}$  des Protein-Rohextrakts werden mit 10  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$  und 0,5  $\mu\text{g}$  des mAb H-AR-2 für 30 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wird das Zelldebris bei 10.000 rpm 10 min in einer Tischzentrifuge sedimentiert und der verbleibende Überstand auf eine mAb Konzentration von 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  eingestellt. Parallel zu den HHV-6 infizierten Zellen werden uninfizierte Zellen als Kontrolle analog behandelt.

### I.5.2 Nachweis von HHV-6 Nukleinsäuren

Der Nachweis von HHV-6 Nukleinsäuren erfolgte mit der Polymerase Kettenreaktion (*engl.* Polymerase chain reaction, PCR). Im Rahmen dieser Arbeit wurden dazu drei PCR Tests entwickelt. Eine semi-nested PCR (snPCR), eine quantitative PCR basierend auf der TaqMan Chemie (TM-PCR) und eine RT-PCR zum Nachweis von HHV-6 RNA (RT-PCR).

**Tabelle 11: PCR-Tests für den Nukleinsäurenachweis von HHV-6**

HHV-6 Test	Primer/Sonde	Matrize	Amplikon
<b>snPCR</b>	1. IE01, IE02	DNA	HHV-6A 563 bp, HHV-6B 911 bp
	2. IE02, IE03		HHV-6A 264 bp, HHV-6B 458 bp
<b>TM-PCR</b>	A: H6fA, H6bA, H6tmA	DNA/(RNA)	HHV-6A: 278 bp
	B: H6fB, H6bB, H6tmB		HHV-6B: 145 bp
<b>RT-PCR</b>	1. U12out, U12back1	RNA	cDNA 468 bp, gDNA 557 bp
	2. U12out, U12back2		cDNA 278 bp, gDNA 367 bp

#### I.5.2.1 Semi-nested HHV-6 PCR (snPCR)

Die Primer für die snPCR sind in putativen "immediate early region" von HHV-6 lokalisiert. Sie binden an DNA beider Varianten A und B, amplifizieren jedoch unterschiedlich große Bereiche von HHV-6A und HHV-6B (Tabelle 11). Die Verwendung des eingerückten Primers IE03 in der 2. PCR führt neben kleineren Produkten zusätzlich zu einer erhöhten Sensitivität.

**Tabelle 12: Primer und Protokoll für die snPCR. Die Genomlokalisierung bezieht sich auf HHV-6 U1102 (Genebank Acc. # M73681) und HHV-6 Z29 (Genebank Acc. # L21760)**

Primer	Sequenz 5' 3'		Genomlokalisierung	
	HHV-6A	HHV-6B	HHV-6A	HHV-6B
IE01	ATG ATG ATA CTG GTT TGA TTA		893-913	893-913
IE02	ATC AGT TTC ATC ATT GTT ATC		1435-1455	1783-1803
IE03	CAG CCT CAG TGA CAG ATC TG		1217-1236	1340-1359
Test-Zusammensetzung			Temperaturprofil	
Probe	2,0 µL (1.)		<i>180 s bei 94 °C</i>	
Produkt der 1. PCR	1,0 µL (2.)			
Primer je	333,0 nM		30 s bei	94 °C
dNTPs je	33,0 µM		30 s bei	47 °C (1.)
10x PCR-Puffer	3,0 µL		30 s bei	48 °C (2.)
Taq Polymerase	1,0 U		60 s bei	72° C <b>30x</b>
Aqua bidest	ad 30,0 µL		300 s bei	72 °C

### I.5.2.2 HHV-6 TM PCR

Für die Quantifizierung von HHV-6 DNA wurde ein Echt-Zeit (*engl.* real-time) PCR Test etabliert. Bei der Echt-Zeit PCR wird die Akkumulation des PCR Produktes im Verlauf der PCR Reaktion zu jeder Zeit gemessen. Damit kann eine Quantifizierung für jede einzelne Probe individuell in der exponentiellen Phase der Amplifikation stattfinden. Im Gegensatz zu Echt-Zeit PCR Tests, wird bei konventionellen quantitativen PCR Methoden nach einer definierten Anzahl von Zyklen analysiert, wobei man keine Auskunft darüber hat, ob sich die PCR bereits in der Plateau-Phase

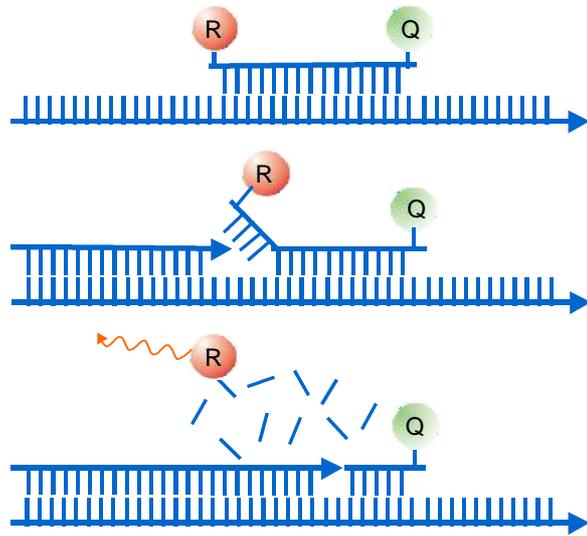


Abbildung 6: Prinzip der TaqMan Reaktion

befindet. Dort besteht keine Abhängigkeit mehr zwischen der Signalstärke und der eingesetzten Menge an DNA-Matrize. Zur Zeit sind unterschiedliche Formate der Echt-Zeit PCR bekannt. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Format handelt es sich um das Exonuklease-Format (siehe Abbildung 6). Zusätzlich zu den Primern befindet sich im Reaktionsgemisch die signal-gebende Exonuklease-Sonde. Diese wird so ausgewählt, daß sie schon bei höheren Temperaturen als die Primer, aber ebenfalls spezifisch, mit dem Amplikon hybridisiert. Sie wird am 5'-Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff markiert. Durch Phosphorylierung am 3'-Ende ist sie nicht verlängerbar und kann nicht als Primer dienen. Bei Anregung der intakten Sonde durch einen Laser wird die entstehende Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs durch die räumliche Nähe des Quencher-Farbstoffs unterdrückt. In der Elongationsphase der PCR Reaktion wird nun die hybridisierte Exonuklease-Sonde durch die 5' 3'-Exonuklease Aktivität der Taq DNA Polymerase degradiert und dadurch die für das Quenching erforderliche räumliche Nähe zwischen Reporter-Farbstoff und Quencher aufgehoben. So entsteht während der Elongation ein Fluoreszenzsignal, welches zu jedem Zeitpunkt proportional zur Menge des PCR Produktes ist. Die kontinuierliche Messung dieses Fluoreszenzsignals erlaubt so die Echt-Zeit Überwachung der PCR Reaktion. Zur Quantifizierung wird für jede Probe bestimmt, bei welchem Zyklus ein definierter Anstieg der Fluoreszenz in der exponentiellen Phase erreicht wird und als  $C_T$ , (*engl.* threshold cycle, Schwellenwert) bezeichnet. Bei diesem Zyklus überschreitet die Fluoreszenz in jeder Probe das 10-fache der Standardabweichung der Zyklen 3-15.

Die Bestimmung der  $C_T$  Werte von bekannten Mengen Matrizen-DNA, z.B. Plasmiden, erlaubt so die Erstellung einer Standard-Geraden, anhand derer die Quantifizierung unbekannter Matrizen-Mengen möglich ist.

Für die TaqMan PCR wurde eine durch Hitze aktivierbare Taq Polymerase verwendet. Dieses Enzym wird erst nach 3 min Inkubation bei 95° C aktiviert, wodurch für alle Proben gleichzeitig ein Heiß-Start ermöglicht wird.

**Tabelle 13: TaqMan-Primer/Sonde und Protokoll für den HHV-6 DNA Nachweis. Die Genomlokalisierung bezieht sich auf HHV-6 U1102 (Genebank Acc. # M73681) und HHV-6 Z29 (Genebank Acc. # L21760)**

Primer	Sequenz 5'	3'	Genomlokalisierung
H6fA	CAT GAA GAT GAT GAC AAT AAA ATG		1081-1104
H6bA	TGG AAC CAT CTT GTT CTG TCC		1337-1357
H6tmA	<b>FAM-CCG CCC AGA <u>T</u> CTG TCA CTG AGG CTG-p</b>		1217-1241
H6fB	GAG ACC GGG TCT GGA CAA CA		1459-1478
H6bB	GAG TTG CTG AGT TGG TAA AGG		1580-1600
H6tmB	<b>FAM-CTC CAA GTG TAC CGA AAC GC <u>T</u> TCC TGG-p</b>		1548-1574
HHV-6A Test-Zusammensetzung			HHV-6B Test-Zusammensetzung
Probe	5,0 µL	Probe	5,0 µL
Primer H6fA	800,0 nM	Primer H6fB	800,0 nM
Primer H6bA	400,0 nM	Primer H6bB	800,0 nM
H6tmA	200,0 nM	H6tmB	200,0 nM
dNTPs je	200,0 µM	dNTPs je	200,0 µM
MgCl <sub>2</sub>	3,0 µM	MgCl <sub>2</sub>	3,0 µM
10x PCR-Puffer	5,0 µL	10x PCR-Puffer	5,0 µL
ROX	1,0 µM	ROX	1,0 µM
Platinum Taq	1,0 U	Platinum Taq	1,0 U
Aqua bidest	ad 50,0 µL	Aqua bidest	ad 50,0 µL
		<i>180 s</i>	<i>bei 94 °C</i>
		25 s	bei 94 °C
		50 s	bei 65 °C
			<b>45x</b>

**FAM:** 6-Carboxyfluorescein, gebunden am 5'-Terminus; **T:** 5-Carboxytetramethylrhodamin (5-TAMRA), gebunden an 5-Ethylamino-dThymidin; **p:** Phosphatrest, gebunden am 3'-Terminus

### I.5.2.3 HHV-6 RT-PCR

Eine qualitative PCR, welche die Unterscheidung zwischen RNA und amplifizierter DNA durch die Größe des PCR Produktes möglich macht, nutzt ein 89 bp großes Intron im U12 Gen von HHV-6. Dabei handelt es sich um eine semi-nested PCR, die nicht in der Lage ist, die Varianten A und B zu differenzieren. Nach der RNA Isolierung aus infizierten Zellen oder dem Überstand infizierter Kulturen erfolgt die cDNA Synthese durch reverse Transkription. Die so erhaltene cDNA wird als Matrize in die PCR eingesetzt.

**Tabelle 14: Primer und Protokoll für die HHV-6 RT-PCR.** Die Genomlokalisierung bezieht sich auf HHV-6 U1102 (Acc. # X83413)

Primer	Sequenz 5' 3'	Genomlokalisierung
U12fout	GAG CTG TCC AAA CTT CAG TTC	21695-21715
U12back1	GCG CAC ATT GAG GAA GCT AGT	22221-22241
U12back2	CGG TTG AAT GAG AAG AGT TGC	22041-22061
Test-Zusammensetzung		Temperaturprofil
Probe	1,0 µL(1.)	<i>180 s bei 94 °C</i>
Produkt der 1. PCR	1,0 µL(2.)	20 s bei 94 °C
Primer je	333,0 nM	20 s bei 53 °C (1.)
dNTPs je	33,0 µM	20 s bei 58 °C (2.)
10x PCR-Puffer	3,0 µL	20 s bei 58 °C (2.)
Taq Polymerase	1,0 U	30 s bei 72° C <b>30x</b>
Aqua bidest	ad 30,0 µL	300 s bei 72 °C

### I.5.3 Gelelektrophorese

Die Produkte der qualitativen PCR-Ansätze wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert. Die Elektrophorese ermöglicht die Identifizierung der PCR-Produkte durch größenspezifische Auftrennung der Amplifikate im Vergleich zu einem Marker definierter Größe. Die Agarose wird durch Kochen in TAE-Puffer gelöst und mit 0,25 µL/mg Ethidiumbromid versetzt. Die flüssige Agarose wird in die Gelkammer gegossen und ein geeigneter Kamm eingesetzt; nach dem Erstarren der Agarose wird die Gelkammer mit TAE-Puffer gefüllt und der Kamm gezogen. Die mit Gellade-Puffer versetzten PCR-Produkte werden in die Taschen pipettiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgt für 30-60 min bei einer Spannung von 80-100 V. In UV-Licht ( $\lambda=256$  nm) wird die DNA durch darin interkaliertes Ethidiumbromid im Gel sichtbar; die Fotodokumentation erfolgte mit einer Polaroid-Kamera.

### I.5.4 Klonierung von PCR-Produkten

Zur Erstellung von Standardgeraden in TaqMan PCR Tests wurden Plasmide kloniert, deren Anzahl durch Messung der OD<sub>260</sub> bestimmt wurde. Mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits der Firma Invitrogen kann in einem 5 min-Schritt das PCR Produkt in einen Plasmidvektor (pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO, 3,9 kb) eingebaut werden. Durch die Matrizen-unabhängige Terminase-Aktivität der Taq-Polymerase wird, in Abhängigkeit von der Sequenz, während der PCR am 3'-Ende der Amplifikate jeweils ein zusätzliches Nukleotid angehängt, häufig ein Adenin. Der Plasmidvektor besitzt an beiden 3'-Enden ein überhängendes Thymidin. Weiterhin ist an die Enden des Plasmids das Enzym Topoisomerase I gebunden, und vermittelt die spezifische

Adenin-Thymidin-Bindung durch Ligation von PCR-Produkt und Vektor. Die Klonierung erfolgte nach den Vorschriften des Herstellers.

Nach der Ligation werden die Plasmide in *E. coli* TOP10 Zellen transformiert, indem 2 µL des Reaktionsansatz zu einer Einheit *One Shot-coli* Zellen gegeben und dann 30 min auf Eis inkubiert werden. Danach werden die Bakterien für 30 s bei 42 °C inkubiert, 2 min auf Eis gestellt und mit 250 µL SOC-Medium für 30 min bei 37 °C unter Schütteln (250 upm) inkubiert. Die Zellen werden auf 2x YT-Platten (mit 50 µg/L X-Gal) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Selektion erfolgte nach Ampicillin Resistenz und X-Gal Umwandlung in 5-Brom-4-chlorindigo, das heißt Klone mit einem Insert bleiben weiß. Nun wird mit einer sterilen Öse ein Teil der weißen Kolonien gepickt und direkt in der entsprechenden PCR Reaktion als Matrize verwendet. Von Kolonien, welche das gewünschte Produkt amplifizieren, wird der Rest von der Platte gepickt und zur Produktion größerer Plasmidmengen verwendet.

#### **I.5.4.1 Plasmidproduktion und -präparation**

Für die Plasmidproduktion werden die entsprechenden Kolonien auf 4 mL 2x YT-Medium überimpft und über Nacht im Schüttler bei 37 °C und 300 upm inkubiert. Die Bakterien werden durch Zentrifugation geerntet (2.500 ×g, 1 min) und durch alkalische Lyse aufgeschlossen. Die Plasmide werden mit dem „QIAprep miniprep system“ entsprechend der Vorschrift des Herstellers gereinigt. So erhaltene Plasmid-Lösungen enthalten  $\sim 10^{11}$ - $10^{12}$  Plasmide/µL und werden nach entsprechender Verdünnung als Matrize für die Erstellung von Standardgeraden benutzt.

#### **I.5.5 Sequenzierung**

Um sicher zu sein, daß die Plasmide die gewünschten Inserts enthalten und die TaqMan Sonde vollständig hybridisieren kann, wurden alle verwendeten Plasmide sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte mittels der Didesoxymethode nach Saenger mit dem Taq Cycle Sequencing Kit. Aus 300-500 ng der zu sequenzierenden Plasmid DNA werden dabei mit dem M13for oder dem M13rev Primer (3,2 pmol) in einem Endvolumen von 20 µL in einer PCR-ähnlichen Reaktion Einzelstrang-Transkripte hergestellt (300 s bei 94 °C; 20 s bei 94 °C, 20 s bei 55 °C, 240 s bei 60 °C; 25 Zyklen), die durch Fluoreszenz-markierte ddNTPs terminiert sind. Zur Abtrennung überschüssiger Fluoreszenzfarbstoff-markierter ddNTPs wird der gesamte Sequenzierungsansatz nach der Inkubation in ein Gemisch von 2,0 µL 3 M Natriumacetat (pH 4,6) und 50 µL Ethanol gegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Der Reaktionsansatz wird anschließend zentrifugiert (20.000 ×g, 20 min), der Überstand verworfen und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation

und dem Verwerfen des Überstands wird das Pellet im Vakuum getrocknet und bis zur Sequenzierung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zur Auflösung von Sekundärstrukturen vor der Sequenzierung wird die DNA in  $4\text{ }\mu\text{L}$  Formamid/EDTA für 2 min bei  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  denaturiert und sofort bis zum Auftragen der Proben auf das Sequenzgel auf Eis gekühlt. Die Sequenzproben werden in einem 6% Polyacrylamid-Gel im Sequenzierautomaten elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Laseranregung durch die spezifischen Fluoreszenz der ddNTPs analysiert.

## **I.6 Versuche am NOD/SCID Mausmodell**

### **I.6.1 NOD/SCID Mäuse**

Arbeiten an NOD/SCID Mäusen wurden in der Arbeitsgruppe Experimentelle Pharmakologie & Onkologie, Berlin-Buch unter der Leitung von Frau Dr. I. Fichtner durchgeführt. Die ursprünglich von Jackson Laboratories, Bar Harbour, USA, stammenden NOD/SCID Mäuse werden in dieser Arbeitsgruppe gezüchtet, mit hämatopoetischen Stammzellen transplantiert, für die Dauer eines Experimentes gepflegt und zur abschließenden Analyse vorbereitet. Dabei wird nach den Grundsätzen der Guten Laborpraxis (GLP), in Übereinstimmung mit dem Deutschen Tierschutzgesetz und unter Berücksichtigung der "UKCCR Guidelines on the Welfare of animals in experimental neoplasia" verfahren.

### **I.6.2 Haltung und Transplantation der Mäuse**

Die immundefizienten Mäuse werden unter sterilen, klimatisierten Bedingungen mit reguliertem Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. 2x pro Woche erfolgt Umsetzung in frische Käfige; die Visitation der Mäuse erfolgt mindestens zwei mal täglich. Die Mäuse werden mit sterilisiertem Trockenfutter und Wasser ernährt.

Die zu transplantierenden Mäuse werden 4 h vor der Transplantation subletal mit 300 cGy aus einer  $^{134}\text{Cs}$   $\gamma$ -Strahlenquelle bestrahlt. Die Tiere sitzen dabei für  $\sim 12$  min einzeln und ohne Narkose in einer PVC-Röhre. Das XenoTansplantat wird in  $300\text{ }\mu\text{L}$  PBS langsam in die Schwanzvene der Maus gespritzt (i.v.). Zur Überwachung der Immundefizienz wurde der Spiegel von Maus IgG im Serum mit einem ELISA gemessen. Bei Ko-Transplantation von hIL-3 produzierenden Zellen werden diese in Matrigelclot subcutan in die rechte Flanke der Mäuse appliziert. Dazu werden zuvor  $1 \times 10^7$  Rat-1 oder Rat-IL-3 Zellen in  $50\text{ }\mu\text{L}$  PBS bei  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit  $50\text{ }\mu\text{L}$  Matrigelclot gemischt. Nach 4 Tagen sind die Ko-Tansplantate ohne Abstoßungsreaktion vaskularisiert. Der Spiegel an humanem IL-3 im Blut der Maus kann dann mit dem IL-3 CytoSet ELISA Kit der Firma Biosource bestimmt werden, wobei nach den Angaben des Herstellers verfahren wird.

### **I.6.2.1 Entnahme von Organen**

Im Verlauf eines Experimentes kann einer Maus alle 14 Tage bis zu 100 µL Blut aus der Schwanzvene entnommen werden. Dazu wird die Schwanzvene angewärmt, mit einer Kanüle angeritzt und das Blut in einem EDTA Röhrchen aufgefangen. Zur Analyse weiterer Organe muß die Maus getötet werden, was durch Dislokation der Nackenwirbel geschieht. Unter sterilen Bedingungen werden zur Gewinnung von Knochenmark die Femures freipräpariert und der Knochen mit einer feinen Kanüle ausgespült. Alle anderen Organe werden zur Analyse operativ entfernt. Besondere Beobachtungen bei der Sektion wurden protokolliert.

### **I.6.2.2 Blutbild**

Zur Erstellung eines Blutbildes wird Blut aus der Schwanzvene entnommen und mit einem automatischen Zählgerät (Coulter Counter) gezählt. Das Gerät bestimmt folgende Parameter: Leukozytenzahl, Erythrozytenzahl, Hämoglobin, Hämatokrit, Mittleres Erythrozytenvolumen, Mittlerer Erythrozyten-Hämoglobingehalt und die Thrombozytenzahl.

### **I.6.3 Bestimmung des Anteils und Phänotyps humaner Zellen in chimären Mäusen**

Der Anteil humaner Zellen in Blut, Knochenmark oder Organen der NOD/SCID Maus erfolgte mit der Durchflußzytometrie (FACS), der Immuncytochemie (POX) oder der PCR. Zusätzlich zu einer bereits existierenden semi-quantitativen PCR wurde in dieser Arbeit eine auf dem TaqMan Prinzip beruhende quantitative duplex PCR (HUm PCR) etabliert.

#### **I.6.3.1 Durchflußzytometrie**

Die Durchflußzytometrie erlaubt die Quantifizierung und Charakterisierung bestimmter Zellen in einer gemischten Zellpopulation. Voraussetzung ist die Markierung des gewünschten Phänotyp-spezifischen Markers mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper. Sind die Zellen mit Antikörpern markiert, werden sie in einem Flüssigkeitsstrahl vereinzelt und dabei von einem Laser angeregt. Ein Detektor zählt nun sowohl die Anzahl aller passierenden Zellen, als auch die Anzahl der Zellen, die mit einem bestimmten Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Auf diese Weise lassen sich sehr einfach 2-3 Antigene in einer Probe gleichzeitig quantifizieren, z.B. durch die Verwendung von Fluorescein und Phycoerythrin gekoppelten Antikörpern. Ein Vorteil dieser Methode ist, daß humane

Zellen nicht nur quantifiziert, sondern auch phänotypisiert werden können, entsprechend der verwendeten mAb gegen Zelltyp-spezifische Antigene.

Für die Bestimmung des humanen Anteils in chimären Mäusen wurden human-spezifische mAb gegen CD45 und HLA-I verwendet. Des Weiteren wurden diverse Kombinationen von mAb zur Identifizierung bestimmter humaner Blutzell-Reihen eingesetzt. Da zur FACS Analyse Einzell-Suspensionen erforderlich sind, können so Blut, Knochenmark, und mit Einschränkung Thymus und Milz untersucht werden; die FACS Analyse anderer Organe ist sehr schwierig.

$5 \times 10^5$  Blut- und Knochenmarkszellen werden vor der Markierung in 500  $\mu$ L FACS Puffer zur Blockierung unspezifischer Bindungen 10 min bei RT mit Fc-Block inkubiert. Dann werden die zellspezifischen mAb in entsprechender Konzentration (siehe Tabelle 15) dazugegeben und weitere 15 min im Dunkeln inkubiert. Man vermischt die Zellen mit den Antikörpern jeweils durch kurzes Vortexen. Es wird mit 5 mL FACS-Puffer gewaschen, die Zellen für 5 min bei 300 xg und 4° C sedimentiert und in 200-300  $\mu$ L FACS-Puffer aufgenommen. Bei der FACS Analyse von Organen werden diese zur Zellvereinzelnung durch ein Zellsieb gepreßt, wobei keine Zellaggregate verbleiben dürfen. Die Färbung erfolgt analog der Färbung von Blutzellen, mit Ausnahme einer 25 min Inkubation mit den zellspezifischen mAb 25 min auf Eis. Die Analyse erfolgt an einem Durchflußzytometer der Firma Becton Dickinson (FACSscan) mit der Software CellQuest 3.1. Zur Quantifizierung werden wenn möglich 10.000 Zellen aufgenommen.

**Tabelle 15: Verwendete Antigen spezifische mAb zum FACS Nachweis von humanen Zellen**

Antigen	Spezifisch für	Funktion
<b>HLA-I</b>	Alle humanen kernhaltigen Zellen	Peptid-Präsentation an CD8 <sup>+</sup> Zellen
<b>HLA-DR</b>	Antigen-präsentierende Zellen	Peptid-Präsentation an CD4 <sup>+</sup> Zellen
<b>CD45</b>	Leukozyten	Tyrosinphosphatase
<b>CD1a</b>	Thymozyten, Dendritische Zellen	Antigenpräsentation
<b>CD3</b>	T-Zellen	Signalvermittlung vom T-Zellrezeptor
<b>CD4</b>	Helfer-T-Zellen, Monozyten	Ko-Rezeptor für MHC-II
<b>CD10</b>	B- und T-Zell Vorläuferzellen im KM	Zink-Metallproteinase
<b>CD13</b>	Mono- und Myelozyten	Zink-Metallproteinase
<b>CD14</b>	Mono- und Myelozyten	Rezeptor für LPS/LBP
<b>CD15</b>	Neutrophile und Eosinophile	
<b>CD19</b>	B-Zellen	Ko-Rezeptor für B-Zellen
<b>CD33</b>	Myeloide Vorläuferzellen, Monozyten	Unbekannt
<b>CD34</b>	Hämatopoetische Stammzellen	Ligand für L-Selektin
<b>CD38</b>	Frühe B- und T-Zellen, Plasmazellen	Unbekannt
<b>CD42b</b>	Megakaryozyten, Blutplättchen	Bindet vWF und Thrombin
<b>CD61</b>	Megakaryozyten, Blutplättchen	Bindet CD41

### I.6.3.2 Immuncytochemische Charakterisierung von humanen Zellen

Der immuncytochemische Nachweis humaner Zellen in chimären Mäusen erfolgte entweder an frischen Einzelzell-Suspensionen von Knochenmark oder Milz, Gefrierschnitten der Milz oder Langzeitkulturen von Chimären-Knochenmark. Zur Vereinzelung von Milzzellen werden diese durch ein Zellsieb gepreßt und anschließend auf Alcian-Grün beschichtete Objektträger aufgetropft, wodurch die Haftung der Zellen an die Objektträger verbessert wird. Chimäre Milzen werden direkt nach der Entnahme halbiert, im Einbettmedium Tissue-Tec eingebettet und kryokonserviert. Vor der Färbung werden sie mit einem Mikrotom geschnitten (0,4-0,6 µm).

Die verwendeten mAb zum POX-Nachweis hämatopoetischer und nicht hämatopoetischer Zellen sind in Tabelle 16 gezeigt. Der Nachweis dieser mAb erfolgte dabei mit dem LSAB2 Kit der Firma DAKO. Bei dieser, auf der Bindung von Streptavidin an Biotin basierenden Detektionsreaktion wird durch Meerrettich-Peroxidase AEC als chromogenes Substrat umgesetzt und färbt Antigen positive Zellen rot (POX Färbung).

**Tabelle 16: mAb zum immuncytochemischen Nachweis von Endothelzellen und Fibroblasten**

Antikörper	Antigen	Spezifisch für
<b>HLA-I</b>	α-Ketten der HLA-A, B,C Genloci	Alle humanen Zellen
<b>CD45</b>	Leukocyte Common Antigen	Alle hämatopoetische Zellen
<b>CD34</b>	CD34	Hämatopoetische Vorläuferzellen
<b>CD38</b>	CD38	Lymphoide Vorläuferzellen
<b>EN-4</b>	CD31 (PECAM-1)*	Endothelzellen
<b>vWF</b>	Von-Willebrand-Faktor	Endothelzellen und Megakaryozyten im KM
<b>PAL-E</b>	Unbekannt	Endothelzellen aus Kapillaren
<b>KDR</b>	VEGF-2 Rezeptor**	Endothelzellen
<b>Fib AS02</b>	Unbekannt	Fibroblasten
<b>Fib 5B5</b>	β-Untereinheit von Prolin-4-Hydroxylase und Disulfidisomerase	humane Fibroblasten
<b>R4/23</b>	Unbekannt	Follikuläre dendritische Zellen
<b>CXCR4</b>	SDF-1 Rezeptor	Hämatopoetischen Stammzellen?

\*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1; \*\*Vascular endothelial growth factor Rezeptor 2

### I.6.3.3 Semi-quantitative PCR zum Nachweis humaner Zellen

Zum Nachweis humaner DNA in chimären Mäusen bietet sich die PCR als sehr sensitive Methode an. Da sie jedoch lediglich spezifisch humane DNA amplifiziert, kann sie keine Aussage über den Phänotyp der humanen Zellen machen, wie es mit der FACS Analyse möglich ist. Eine bereits publizierte PCR amplifiziert α-Satelliten

DNA des humanen Chromosoms 17, welcher bei der Maus nicht identifiziert werden konnte. Dabei werden 500 ng DNA in die PCR eingesetzt und die Produkte durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Zur semi-Quantifizierung vergleicht man jetzt die Intensität der Banden im Gel mit denen einer Standardreihe, welche durch Verdünnung definierter Anteile humaner DNA in muriner DNA erzeugt wurde (Möbest, 1999).

**Tabelle 17: Primer und Protokoll für die semi-quantitative PCR zum Nachweis humaner Zellen.** Die Genomlokalisierung bezieht sich auf (Genebank Acc. # M13882)

Primer	Sequenz 5' 3'		Genomlokalisierung		
17a1	GGG ATA ATT TCA GCT GAC TAA ACA G		15-39		
17a2	TTC CGT TTA GTT AGG TGC AGT TAT C		867-891		
Test-Zusammensetzung			Temperaturprofil		
Probe	250,0 ng				
Primer	je 250,0 nM		<i>10 min</i>	<i>bei</i>	<i>94 °C</i>
dNTPs	je 200,0 µM		60 s	bei	94 °C
10x PCR-Puffer	5,0 µL		60 s	bei	60° C
MgCl <sub>2</sub>	2,0 mM				<b>35x</b>
<u>Ampli Taq Gold</u>	<u>1,0 U</u>		10 min	bei	72 °C
Aqua bidest	ad 50,0 µL				

#### I.6.3.4 Duplex PCR Test Quantifizierung humaner Zellen (HUmU PCR)

Bei der HUmU PCR handelt es sich um eine duplex PCR, die in einem Reaktionsansatz sowohl humane als auch murine DNA quantifiziert. Primer und Exonuklease-Sonde beider Tests sind im TNF- $\alpha$  Gen des Menschen und der Maus lokalisiert. Während die Exonuklease-Sonde für den Nachweis humaner DNA (HU Test) als Reporterfarbstoff eine FAM Markierung (6-carboxy-Fluorescein,  $\lambda_{\max\text{Emission}}=520$  nm) trägt, ist die Exonuklease-Sonde für den Nachweis muriner DNA (mu Test) mit TMR (Tetramethyl-Rhodamin,  $\lambda_{\max\text{Emission}}=560$  nm) markiert. Durch Messung der Emission beider Fluoreszenzfarbstoffe kann die Amplifikation humaner und muriner DNA parallel in einem Reaktionsgefäß verfolgt und in "Echt-Zeit" Format quantifiziert werden. Als Quencher wird in diesem Fall DABCYL verwendet, da er im Gegensatz zu TAMRA keine Eigenfluoreszenz besitzt.

**Tabelle 18: TaqMan Primer/Sonde und Protokoll für den HUmu Test. Die Genomlokalisierung bezieht sich auf das humane TNF- Gen (Genebank Acc. # X02910) und das murine TNF- Gen (Genebank Acc. # Y00467)**

Primer	Sequenz 5' 3'	Genomlokalisierung
HUf	AGG AAC AGC ACA GGC CTT AGT G	1995-2016
HUb	AAG ACC CCT CCC AGA TAG ATG G	2105-2131
HUtm	<b>FAM-CCA GGA TGT GGA GAG TGA ACC GAC ATG (D)T-p</b>	2468-2489
muf	GGC TTT CCG AAT TCA CTG GAG	6455-6475
mub	CCC CGG CCT TCC AAA TAA A	6700-6718
mutm	<b>TMR-ATG TCC ATT CCT GAG TTC TGC AAA GGG A(D)-p</b>	6482-6509
HUmu Test-Zusammensetzung		Temperaturprofil
Probe	5,0 µL	
Primer HU	800,0 nM	
Primer mu	400,0 nM	
Exonuklease-Sonde	200,0 nM	<i>180 s bei 94 °C</i>
dNTPs je	200,0 µM	
MgCl <sub>2</sub>	3,0 µM	20 s bei 94 °C
10x PCR-Puffer	5,0 µL	30 s bei 64 °C
ROX	1,0 µM	
Platinum Taq	1,0 U	
Aqua bidest	ad 50,0 µL	<b>45x</b>

**FAM:** 6-Carboxyfluorescein, gebunden am 5'-Terminus; **TMR:** Tetramethyl-Rhodamine, gebunden an 5-Ethylamino-dThymidin; **(D):** (4-(4'-(Dimethylaminophenylazo)-Benzoessäure), (DABCYL); **p:** Phosphatrest, gebunden am 3'-Terminus

### I.7 Nachweis von Endothelzellen

Der Nachweis von Endothelzellen erfolgte in chimären Mäusen und CD34-LTC mit Hilfe der Immuncytochemie oder der quantitativen RT-PCR.

Die immuncytochemische Charakterisierung erfolgte analog des Nachweises nicht hämatopoetischer Zellen in Langzeitkulturen chimären Knochenmarks.

Zum Nachweis von endothelzell-spezifischen RNAs wurden 3 TaqMan Tests entwickelt, die CD31 (PECAM), KDR (VEGF-2R) und von Willebrandfaktor RNA quantifizieren. Primer und Exonuklease-Sonde wurden so ausgewählt, daß durch den Einschluß großer Introns unter den optimalen Reaktionsbedingungen ausschließlich cDNA amplifiziert wird. Als Referenz-Gen wurde das 18S Gen ausgewählt. Die Sonde zum Nachweis von 18S RNA ist mit dem Reporterfarbstoff TET markiert, wodurch eine simultane Amplifikation der Referenz mit den Genen CD31, KDR und vWF möglich ist. Alle 4 PCR Tests können unter den gleichen Temperaturbedingungen und dadurch parallel durchgeführt werden. Alternativ wurde als Referenz-Gen  $\beta$ -Aktin amplifiziert. Da die Temperaturbedingungen dafür jedoch von denen der CD31, KDR und vWF PCRs abweichen, mußte diese PCR getrennt durchgeführt werden.

**Tabelle 19: Primer und Protokoll für PCR Tests zum Nachweis von Endothelzellen. Die Genomlokalisierung bezieht sich auf KDR mRNA (Genebank Acc. # AF063658), von Willebrand Faktor Exons 23-34 (Genebank Acc. # M60675, M36184), PECAM-1 mRNA (Genebank Acc. # L34640), 18S RNA (Genebank Acc. # L21760)**

Primer	Sequenz 5' 3'	Genomlokalisierung
CD31f	GAG GTT CTG AGG GTG AAG GTG A	891-906
CD31b	TCC ACC ACC TTA CTT GAC AGG A	4260-4281
CD31tm	<b>F</b> -AGC CCC GGT GGA <b>T</b> GGA GGT CCA GA- <b>p</b>	4231-4253
KDRf	ACT TTG AGC ATG GAA GAG GAT T	3547-3558
KDRb	GTC CAT TCC ACC AAA AGA TG	3839-3858
KDRtm	<b>F</b> -CTG TCC GTC TGG TTG TCA TCT GGG <b>A</b> T- <b>p</b>	
vWFf	AGC ATG GCA AGG TGG TGA C	3687-3705
vWFb	TAC CCG TTC TCC CGG AGA TT	4481-4500
vWFtm	<b>F</b> -ACA TTG TGC CCC AGA G <b>C</b> T GCG AGG- <b>p</b>	3719-3728+4462-4475
18Sf	CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA	551-570
18Sb	GCT GGA ATT ACC GCG GCT	720-737
18Stm	<b>TET</b> -GCT-GGC-ACC-AGA-CTT-GCC- <b>C</b> T- <b>p</b>	699-718
Tests-Zusammensetzung		Temperaturprofil
Probe	1,0 µL	
Primer f*	300,0 nM	
Primer b*	300,0 nM	
tm	150,0 nM	<u>180 s bei 94 °C</u>
dNTPs	je 100,0 µM	20 s bei 94 °C
MgCl <sub>2</sub>	2,4 µM	30 s bei 62 °C
10x PCR-Puffer	3,0 µL	30 s bei 72 °C
ROX	1,0 µM	
Platinum Taq	1,0 U	
Aqua bidest	ad 30,0 µL	<b>40x</b>

**FAM:** 6-Carboxyfluorescein, gebunden am 5'-Terminus; **T:** 5-Carboxytetramethylrhodamin (5-TAMRA), gebunden an 5-Ethylamino-dThymidin; **TET** Tetrachloro-6-carboxyfluorescein; **p:** Phosphatrest, gebunden am 3'-Terminus\*: Bei duplex PCR Tests werden die 18S Primer 60 nM eingesetzt.

**Tabelle 20: Primer und Protokoll für die quantitative PCR zum Nachweis von  $\beta$ -Aktin.** Die Genomlokalisierung bezieht sich auf (Genebank Acc. # d28354)

Primer	Sequenz 5' 3'	Genomlokalisierung
$\beta$ -Aktin se	AGC CTC GCC TTT GCC GA	
$\beta$ -Aktin as	CTG GTG CCT GGG GCG	
$\beta$ -Aktin Probe	F-CCG CCG CCC <u>GTC</u> CAC ACC CGC C-p	
Tests-Zusammensetzung		Temperaturprofil
Primer je	500,0 nM	
Exonuklease-Sonde	1,0 $\mu$ M	
dNTPs je	200,0 $\mu$ M	<u>5 min bei 94 °C</u>
10x PCR-Puffer	5,0 $\mu$ L	30 s bei 94 °C
MgCl <sub>2</sub>	4,5 mM	60 s bei 67° C <b>45x</b>
ROX	1,0 $\mu$ M	
<u>Ampli Taq Gold</u>	1,0 U	
Aqua bidest	ad 50,0 $\mu$ L	

Die Standardgerade zur Berechnung der Anzahl humaner  $\beta$ -Aktin Gene wurde aus (Kreuzer, 1999) entnommen.

## II. Chemikalien und Reagenzien

Soweit nicht anders angegeben stammen alle Chemikalien von Sigma, Deisenhofen.

### II.1 Puffer

#### APAAP Blockierungspuffer

Magermilchpulver	5,0 g
NaN <sub>3</sub>	0,1 g
TBS pH 7,6	ad 100,0 mL

APAAP-Blockierungspuffer wird bei 4° C gelagert.

#### APAAP Waschpuffer (20x)

Tris-Base	18,0 g
Tris-Cl	137,0 g
NaCl	175,0 g
1M HCl	ad pH 7,6
Aqua bidest.	ad 1000,0 mL

Die 20x Stammlösung wird vor der Benutzung 1:20 mit Aqua bidest. verdünnt.

#### FACS Puffer

Glucose	18,0 g
NaN <sub>3</sub>	2,0 g
1x PBS pH 7,2	ad 1000,0 mL

#### Fibronectin Beschichtungspuffer

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,12 g
NaCl	8,76 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000,0 mL

Der pH-Wert wird mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt und die Lösung steril filtriert. Für 10 cm<sup>2</sup> zu beschichtenden Flaschenbodens werden 100 µg Fibronectin (1 µg/µl) zu 900 µl Beschichtungspuffer gegeben.

#### Ficoll-Puffer

EDTA	2,0 mM
1x PBS pH 7,2	ad 1000,0 mL

Der Ficoll-Puffer wird für 2 h bei 121° C autoklaviert und bei 4° C gelagert.

#### Gellade Puffer

Tris-HCl, pH 7,5	10,0 mM
EDTA	2,0 mM
Glycerin	15,0 % (v/v)
Bromphenolblau (Serva, Heidelberg)	0,1% (w/v)

### HEPES

1 M HEPES-Pufferlösung Seromed (Biochrom, Berlin)  
 HEPES: (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2'-ethansulfonsäure)

### MACS-Puffer

FKS	5,0 mL
EDTA	2,0 mM
1x PBS pH 7,2	ad 1000,0 mL

Der MACS-Puffer wurde sterilfiltriert und entgast.

### Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20 g
NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
1M HCl	ad pH 7,2
Aqua bidest. 1M HCl	ad 1000,0 mL

oder

10x PBS (Gibco, Rockville)	100,0 mL
Aqua bidest.	ad 1000,0 mL

### Puffer A für Cytopräparate

FKS (Gibco, Rockville)	10,0 mL
Bovine Serum Albumin	10,0 g
1x PBS	ad 100,0 mL

BSA wird über Nacht durch Rühren gelöst und in Aliquots à 1 mL bei -20° C gelagert.

### TAE-Puffer

Tris-Base	400,0 mM
Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O	20,0 mM
Natriumacetat	200,0 mM
Essigsäure (Serva, Heidelberg)	296,0 mM

### Tris-Stammlösung 1,0 M

Tris-Base	121,40 g
Aqua bidest.	ad 1000,00 mL

Für die benötigten Puffer-Endkonzentrationen wird die Stammlösung entsprechend mit Aqua bidest. verdünnt und der pH-Wert mit HCl auf den gewünschten Wert eingestellt.

### TYR Waschpuffer (20x)

NaCl	17,5 g
Tween-20	2,0 mL
Tris-Stammlösung pH7,6	ad 100,0 mL

## II.2 Zellkultur

### II.2.1 Medien

Soweit nicht anders vermerkt wurden Zellkulturmedien als Fertigmedien bezogen und entsprechend modifiziert.

#### RPMI 1640 (GIBCO, Rockville)

FKS (GIBCO, Rockville)	10,0 % (v/v)
Penicillin 100,0 U/mL	
Streptomycin	100,0 µg/mL
Glutamax I (GIBCO, Rockville)	200,0 mM
zur Stimulation von CB-MNC	
rhIL-2	10,0 U/mL
Phytohämagglutinin (PHA)	5,0 µg/mL

#### Endothelzell-Wachstums-Medium 1-4 (EWM1-EWM4)

Tabelle 21: Zusammensetzung der Zellkulturmedien EWM1-EWM4

Ingredientien	EWM-1	EWM-2	EWM-3	EWM-4
Medium	IMDM (GIBCO)	M199 (PARKER)	M199 (PARKER)	IMDM (GIBCO)
FKS	20%	∅	20%	10%
Pferdeserum	∅	20%	∅	∅
HEPES	25 mM	∅	25 mM	∅
Heparin	50 µg/mL	50 µg/mL	∅	50 µg/mL
Glutamax	2 mM	2 mM	2 mM	∅
2-Mercaptoethanol	0,01 mM	0,05 mM	0,01 mM	∅
ECGS*	∅	50 µg/mL	∅	80 µg/mL
rhEPO <sup>#</sup>	∅	∅	2U/mL	∅
rhbFGF <sup>§</sup>	∅	10 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL
rhVEGF <sup>§</sup>	∅	∅	20 ng/mL	∅
rh-IL6	∅	∅	10 ng/mL	∅
rhPDGF**	∅	∅	50 ng/mL	∅
rh-IL-2	25 U/mL	25 U/mL	∅	∅
5637-CM <sup>\$\$</sup>	10%	∅	∅	∅

\*Endothelial Cell Growth Supplement; #rh Erythropoietin (Roche, Mannheim), <sup>§</sup>rh basic Fibroblast Growth Factor; <sup>§</sup>rh Vascular Endothelial Growth Factor; \*\*rh Platelet Derived Growth Factor; <sup>\$\$</sup> Konditioniertes Medium der Zelllinie 5637

**Myelocult/IL-3 (Stem Cell Technologies)**

	KÜS-IL-3	10,0 % (v/v)
oder	rh-IL-3	200,0 g/mL

**BM-LTM (IMDM, GIBCO, Rockville)**

	FKS (Gibco, Rockville)	15,0 % (v/v)
	KÜS-IL-3	10,0 % (v/v)
oder	rh-IL-3	200,0 g/mL

**DMEM (GIBCO, Rockville)**

	FKS (Gibco, Rockville)	10,0 % (v/v)
	Penicillin	100,0 U/mL
	Streptomycin	100,0 µg/mL
	Glutamax	200,0 mM
	MEM nicht essentielle Aminosäuren	1,0 % (v/v)
	MEM Vitamine	1,0 % (v/v)
	2-Mercaptoethanol	0,05 mM

**HUVEC-Medium (M199 Earle)**

	FKS (Gibco, Rockville)	20,0 % (v/v)
	Penicillin	100,0 U/mL
	Streptomycin	100,0 µg/mL
	Glutamax	200,0 mM
	RDGF	1,0 %

**II.3 Sonstiges**

**CD34-Progenitor Cell Separation Kit** Myltenyi, Bergisch Gladbach

**Ficoll-Hypaque Trennlösung ( $r=1,077 \text{ g/cm}^3$ )** Seromed, Berlin

**Fötale Kälberserum (FKS)**

Fötale Kälberserum (GIBCO BRL, Rockville, USA) wird bei einer Temperatur von 56 °C über 30 min hitzeinaktiviert.

**IL-3 CytoSet ELISA Kit** Bio-Source 8, Wien

**Matrigelclot** Serva, Heidelberg

**Trypanblau**

**Trypsinlösung 2 % (w/v)**

### Trypsinpuffer

NaCl	800,00 mg
KCl	40,00 mg
NaHCO <sub>3</sub>	37,50 mg
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	6,00 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,00 mg
Glucose	100,00 mg
NaOH	ad pH 7,6
Aqua bidest	ad 100,00 mL

### Trypsin-Stammlösung, (50x)

Trypsin (Difco Laboratories, Detroit MI, USA)	10,00 g
Diluent	ad 100,00 mL

Der Trypsinpuffer wird für 2 Stunden bei 121 °C autoklaviert, die Trypsin-Stammlösung wird sterilfiltriert und in Portionen à 2 mL bei -20 °C eingefroren. Die Trypsinlösung wird direkt vor Gebrauch durch Zugabe von 2 mL Trypsin-Stammlösung zu 100 mL Diluent hergestellt.

## II.4 Nukleinsäure-Techniken

### Kits

Blood & Tissue DNA Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
Taq Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Leek, NL

### Enzyme

AmpliTaq Gold	Perkin Elmer, Weiterstadt
Superscript II Reverse Transkriptase	GIBCO, Rockville, USA
Platinum Taq DNA Polymerase	GIBCO, Rockville, USA
Tth Polymerase	Rapidozym, Berlin

### Reagenzien

Agarose	
Ammoniumpersulfat	
Ampicillin	
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid)	
Carboxy-X-Rhodamin, ROX	Molecular Probes, Leiden, NL
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	
dNTPs	Perkin Elmer, Weiterstadt
DTT Lösung 0,1 M	GIBCO, Rockville, USA
Ethidiumbromid (10 mg/mL in Aqua bidest.)	

Ethanol	Serva, Heidelberg
MgCl <sub>2</sub> Lösung (50 mM)	GIBCO, Rockville, USA
Mineralöl	
MnCl <sub>2</sub>	
Natriumacetat	
Random Hexamers 3,0 µg/µL	GIBCO, Rockville, USA
RNAsin	GIBCO, Rockville, USA
TEMED	

### Primer und Exonuklease Proben

Alle Oligonukleotide für die PCR wurden bei TIB-MOLBIOL, Berlin, synthetisiert und HPLC gereinigt.

### 2x YT-Medium

Bacto-Trypton	16,0 g
Bacto-Hefeextrakt	10,0 g
NaCl	5,0 g
Aqua bidest.	ad 1000,0 mL

Nach Einstellen des pH-Werts auf 7,0 wird das Medium autoklaviert; für die Herstellung von Agarplatten werden dem Medium 15 g/L Bacto-Agar und 50 µg/L Ampicillin zugesetzt.

### Formamid/EDTA

Formamid	10,0 µL
50 mM EDTA pH 8.0	50,0 µL

### Sequenzgel

40 % Acrylamid/Bisacrylamid 19:1 (Serva, Heidelberg)	7,5 mL
Harnstoff (Merck, Darmstadt)	30,0 g
10x TBE	6,0 mL
Aqua bidest.	25,0 mL

## II.5 Antikörper-Techniken

### Kits

CSA System, Peroxidase for Mouse Antibodies	DAKO, Hamburg
LSAB 2 System, Peroxidase	DAKO, Hamburg

### Reagenzien

Aceton	Serva, Heidelberg
Anti-Fade Mounting Medium	Molecular Probes, Leiden, NL
Glyceringelatine	DAKO, Hamburg
Dimethylformamid	Serva, Heidelberg
EDTA	
Evans Blue	

Fast Red	
Levamisol	
Mayers Hämalaun Lösung	Serva, Heidelberg
Naphtol-AS-MX-Phosphat	
Phenylmethyldisulfonsäurefluorid (PMSF)	
0,1% Poly-L-Lysin	
Tissue Tec	Jung, Nußloch

### Antikörper

**Tabelle 22: HHV-6 spezifische mAb und.....**

Name	Hersteller	Konz.*
H-AR-2	Prof. Luka	10 µg
H-AR-2-Bio*	Prof. Luka	10 µg
H-AR-6	Prof. Luka	10 µg
H-AR-9	Prof. Luka	10 µg
H-IG-20	Prof. Luka	20 µg
H-Pol-10	Prof. Luka	10 µg
H-WL-5	Prof. Luka	10 µg
H-WL-8	Prof. Luka	10 µg
gp60/110	NMI	20 µg
p41	Biozol	20 µg
gp106	TEBU	2 µg

\* mAb H-AR-2 biotinyliert bei BioGenes, Berlin

**Primär-Ab für die Immuncytochemie**

Name	Hersteller	Konz.*
HLA-I	DAKO	2,5 µg
CD45	DAKO	2,5 µg
CD34	DAKO	5,0 µg
CXCR4	Pharm	5,0 µg
EN-4	Monosan	2,5µg
vWF	DAKO	2,5µg
PAL-E	Monosan	2,5µg
KDR	Dr. Baron	2,5µg
Fib AS02	Dianova	2,5µg
Fib 5B5	DAKO	2,5µg
R4/23	DAKO	2,5µg

Pharm: Pharmingen, Freiburg; Monosan, Dianova,

**Tabelle 23: mAb für die FACS Analyse**

Name	Hersteller	Markierung	Menge
HLA-I	Pharm	PE	20 µL
HLA-DR	Pharm	FITC	20 µL
CD1a	DAKO	PE	10 µL
CD2	Pharm	FITC	20 µL
CD3	Pharm	FITC	20 µL
CD4	Pharm	PE	20 µL
CD7	Pharm	FITC	20 µL
CD10	DAKO	PE	20 µL
CD13	Coulter	PE	10 µL
CD13	Coulter	PE	10 µL
CD14	Pharm	FITC	5 µL

Name	Hersteller	Markierung	Menge
CD14	Pharm	FITC	5 µL
CD15	Pharm	FITC	20 µL
CD19	Pharm	FITC	20 µL
CD33	Pharm	PE	20 µL
CD34	BD	PE	10 µL
CD38	Pharm	FITC	20 µL
CD42b	Pharm	PE	20 µL
CD45	Pharm	FITC	20 µL
CD56	Caltag	PE	10 µL
CD61	Pharm	PE	20 µL
CXCR4	Pharm	PE	20 µL

**Tabelle 24: Sekundär-Antikörper spezifisch für:**

Name	Hersteller	Konz	Markierung
mouse IgG	Sigma	1:200	FITC
mouse IgG	Mol Prob	20 µg/mL	Alexa488
mouse IgG	Mol Prob	20 µg/mL	Alexa532
mouse IgG	Mol Prob	20 µg/mL	Alexa546
mouse IgG	Mol Prob	20 µg/mL	Alexa568
mouse IgG	Mol Prob	20 µg/mL	Alexa594
FITC	Mol Prob	5 µg/mL	Alexa488
Biotin	Dianova	5 µg/mL	TMR
Brücken-Ab (mouse IgG)	DAKO	100 µg/mL	∅
APAAP Komplex	DAKO	100 µg/mL	∅

**Tabelle 25: Gegenfärbungen**

Name	Hersteller	Konz	Markierung
Evans Blue	Sigma	0,01% (v/v)	∅
Phalloidin	Mol Prob	0,001U/mL	Alexa488
Concanavalin A	Mol Prob	20 µg/mL	Alexa488
Concanavalin A	Mol Prob	20 µg/mL	Alexa546
Concanavalin A	Mol Prob	20 µg/mL	Alexa594
DAPI*	Mol Prob	20 µg/mL	∅

\*(4',6-diamidino-2-Phenylindol)

### APAAP Färbelösung

Naphtol-AS-MX-Phosphat in 1 mL DMF	0,01 g
Tris-Cl pH 8,2	49,0 mL
1M Levamisol	100,0 µL
Fast Red	0,05 g

Naphtol-AS-MX-Phosphat wird in 1 mL DMF gelöst und dann zu 49 mL Tris-Cl pH 8,2 mit Levamisol gegeben. Man rührt, bis unmittelbar vor der Färbung das Fast Red dazugegeben wird.

### III. Geräte und Materialien

Die zur normalen Laboreinrichtung gehörenden Glas- und Plastikutensilien werden hier nicht gesondert aufgeführt.

#### III.1 Zellkultur

Sterile Einwegartikel für die Zellkultur	NUNC Intermed, Roskilde, DK
Feuchtbrutschrank mit CO <sub>2</sub> -Begasung	Heraeus, Göttingen
Inversmikroskop	Carl Zeiss, Jena
FACScan und FACSCalibur Durchflusszytometer	Becton Dickinson
Coulter Counter	

#### III.2 Nukleinsäure-Techniken

PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plates, Optical Caps Optical Tubes	
ABI Prism 7700 Sequence Detector System	
ABI Prism 310 Genetic Analyzer	PE Biosystems, Foster City CA
Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen
UV-Transilluminator	Heraeus, Hanau

#### III.3 Antikörper-Techniken

Maskierte Objektträger, Teflon beschichtet	Medco Diagnostica, München
Alcian Grün Objektträger	Paul Marienfelder, Mergentheim
Lichtmikroskop Axiophot und konfokales Laserrastermikroskop cLSM 510	Carl Zeiss, Jena
Cytozentrifuge Cytospin 3	Shandon, Frankfurt/Main
Trichter und Klammern für Cytopräparate	Shandon, Frankfurt/Main
Färbekassetten	Shandon, Frankfurt/Main