

Aus dem Robert Koch-Institut Berlin
eingereicht über
den Fachbereich Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Molekulare Untersuchung des Ratten-Cytomegalovirus CD200-Homologs

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Tina Westerholt

Tierärztin aus Lübbecke-Nettelstedt

Berlin 2011

Journal-Nr.: 3529

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter: PD Dr. K. Borchers
Zweiter Gutachter: PD Dr. S. Voigt
Dritter Gutachter: PD Dr. M. Veit

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

rats, cytomegalovirus, homologous recombination, growth curves, real time
PCR, macrophages

Tag der Promotion: 08.02.2012

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-115-4

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2011

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written
authorization of the publisher.

Coverbild vorne © Sashkin - Fotolia.com

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2012

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Although this may seem a paradox, all exact science is dominated by the idea of approximation. When a man tells you that he knows the exact truth about anything, you are safe in inferring that he is an inexact man.

(Chapter 2 of "The Scientific Outlook" by Bertrand Russell, 1st Ed., 1931)

I. Inhaltsverzeichnis

I.	INHALTSVERZEICHNIS.....	4
II.	EINLEITUNG.....	7
1	LITERATURÜBERSICHT	8
1.1	EINTEILUNG DER HERPESVIREN.....	8
1.2	ÜBERSICHT DER HERPESVIRUSINFEKTIONEN BEI MENSCH UND TIER.....	9
1.3	CYTOMEGALOVIREN.....	11
1.3.1	Das Ratten-Cytomegalovirus (RCMV).....	12
1.3.2	CD200 und die Interaktion mit dem CD200-Rezeptor (CD200R).....	13
1.3.3	Das RCMV-CD200 Homolog.....	14
1.3.4	Virale CD200-Homologe	15
1.4	HYPOTHESE.....	17
1.5	ZIELSETZUNG.....	18
2	MATERIAL UND METHODEN.....	19
2.1	MATERIAL.....	19
2.1.1	Software	19
2.1.2	Chemikalien.....	19
2.1.3	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	20
2.1.4	Enzyme	21
2.1.5	Puffer und Lösungen.....	21
2.1.6	Antikörper.....	23
2.1.7	Zelllinien und Medien	23
2.1.8	Bakterienstämme und Bakterienmedien	24
2.1.9	Plasmide.....	24
2.1.10	Kits	24
2.1.11	Oligonukleotide und TaqMan-Sonden	25
2.2	METHODEN.....	26
2.2.1	Zellkultur.....	26
2.2.2	Zellzahlbestimmung mithilfe der Neubauerkammer	26
2.2.3	Präparation eines Virusstocks.....	27
2.2.4	Präparation viraler DNA	27
2.2.5	Co-Transfektion eukaryotischer Zellen mit CaHPO ₄	28
2.2.6	Isolierung der vCD200-Virusrevertante.....	29
2.2.7	Bestimmung des Virustiters.....	30
2.2.8	Wachstumskurven	31
2.2.9	DNA-Isolierung aus Leber und Milz	32
2.2.10	RNA-Isolierung aus Organen	32
2.2.11	Herstellung von cDNA.....	32
2.2.12	Polymerasekettenreaktion (PCR)	33
2.2.13	Agarose-Gelelektrophorese.....	34
2.2.14	DNA-Eluierung aus Agarosegelen.....	35
2.2.15	Herstellung elektrokompetenter Zellen	35
2.2.16	TOPO-Klonierung	36
2.2.17	Reinigung und Isolierung von Plasmid-DNA	36
2.2.18	TaqMan-PCR (Real Time PCR)	37
2.2.19	DNA-Restriktionsverdau.....	38
2.2.20	Southern Blot.....	39

2.2.21	Sequenzierung von DNA.....	41
2.2.22	Auswertung der Sequenzierung	42
2.2.23	BCA-Assay zur Proteinbestimmung.....	42
2.2.24	SDS-Gelelektrophorese	43
2.2.25	Western Blot.....	45
2.2.26	Kopplung von Antikörpern mit Biotin.....	46
2.2.27	Cytospins.....	46
2.2.28	Durchflusszytometrische Analysen.....	47
2.2.29	Untersuchung von Tierproben.....	49
3	ERGEBNISSE.....	51
3.1	HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINER RCMV CD200-REVERTANTE.....	51
3.1.1	Wachstumsverhalten von RCMV-wt, RCMV- Δ CD200 und RCMV-revCD200	54
3.2	PROTEIN-EXPRESSION VON vCD200 UND CD200R IN VITRO	56
3.2.1	Expression von vCD200 auf REF und Makrophagen nach RCMV-Infektion.....	56
3.2.2	Nachweis der Expression von CD200R auf Makrophagen.....	57
3.2.2.1	Titration des CD200-Rezeptor-Antikörpers für die Durchflusszytometrie.....	57
3.3	NACHWEIS DER iNOS-EXPRESSION IN MAKROPHAGEN IN VITRO	58
3.3.1.1	Stimulierung der iNOS-Expression mit LPS in der Makrophagenzelllinie.....	59
3.3.1.2	Einfluss der Makrophagen-Stimulation auf die Expression von CD200R.....	61
3.3.1.3	Vergleich der iNOS-Expression bei REF/Makrophagen co-Kultur.....	62
3.4	UNTERSUCHUNG DES PROBENMATERIALS AUS TIEREN	63
3.4.1	Biotinylierung und Antikörper-Titration für die Durchflusszytometrie.....	64
3.4.1.1	Titration des Makrophagenantikörpers für die Durchflusszytometrie	65
3.4.1.2	Titration des iNOS-Antikörpers für die Durchflusszytometrie.....	65
3.5	iNOS-EXPRESSION DER PERITONEALEN MAKROPHAGEN EX VIVO	67
3.6	QUANTITATIVER NACHWEIS VON vCD200, CD200, CD200R UND iNOS.....	69
3.6.1	Etablierung der Standardreihen.....	69
3.6.2	Optimierung der cDNA-Synthese für die RealTime-PCR	70
3.7	BESTIMMUNG DER VIRUSLAST IN DER MILZ	72
3.7.1	Untersuchung der Gentranskription von vCD200, CD200, CD200R und iNOS in der Milz und peritonealen Makrophagen.....	74
3.8	IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG DER MILZSCHNITTE.....	78
3.8.1	Expression des Enzyms iNOS in der Milz.....	78
3.8.2	Unterschiedliche Expressionsstärke der MHC-Klasse-II-Moleküle in der Milz.....	79
4	DISKUSSION	80
4.1	HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINER RCMV CD200-REVERTANTE.....	80
4.2	EXPRESSION VON vCD200, CD200R UND iNOS IN RATTENEMBRYOFIBROBLASTEN UND MAKROPHAGEN	81
4.3	AKTIVIERUNGSZUSTAND PERITONEALER MAKROPHAGEN NACH RCMV-INFEKTION.....	82
4.4	EINFLUSS DER INFEKTION AUF DIE iNOS-EXPRESSION IN DEN PERITONEALEN MAKROPHAGEN UND DER MILZ	84
4.5	BEDEUTUNG DER MHC-KLASSE-II-EXPRESSION IN DER MILZ	86
4.6	ÜBERPRÜFUNG DER EINGANGS GESTELLTEN HYPOTHESE UND AUSBLICK	88
5	ZUSAMMENFASSUNG	90
6	SUMMARY	92
III.	ANHANG.....	94
7	VEKTORKARTEN	94

8	STANDARDGERADEN UND ROHDATEN	98
8.1	STANDARDGERADE UND ROHDATEN CD200	98
8.2	STANDARDGERADE UND ROHDATEN vCD200	99
8.3	STANDARDGERADE UND ROHDATEN CD200R	100
8.4	ROHDATEN iNOS	101
8.5	ROHDATEN TAQMAN-PCR MAKROPHAGEN	101
	8.5.1 Rohdaten TaqMan-PCR iNOS	101
	8.5.2 Rohdaten TaqMan-PCR CD200	104
	8.5.3 Rohdaten TaqMan-PCR vCD200	107
	8.5.4 Rohdaten TaqMan-PCR CD200R	110
	8.5.5 Rohdaten TaqMan-PCR c-myc	112
8.6	ROHDATEN TAQMAN-PCR MILZ	115
	8.6.1 Rohdaten TaqMan-PCR iNOS	115
	8.6.2 Rohdaten TaqMan-PCR CD200	118
	8.6.3 Rohdaten TaqMan-PCR vCD200	121
	8.6.4 Rohdaten TaqMan-PCR CD200R	124
	8.6.5 Rohdaten TaqMan-PCR cMyc	127
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	130
10	TABELLENVERZEICHNIS	131
11	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	132
12	LITERATURVERZEICHNIS	135
13	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	142
14	DANKSAGUNG	143
15	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	144

II. Einleitung

Kern dieser Arbeit ist die Untersuchung des CD200-Gens des England-Isolates des Rattencytomegalovirus (RCMV). Bei diesem Gen handelt es sich um ein virales Homolog zum zellulären CD200-Gen der Ratte (Voigt et al. 2005). RCMV ist ein Herpesvirus, welches ebenso wie das murine Cytomegalovirus (MCMV) und das humane Cytomegalovirus (HCMV) den β -Herpesvirinae zuzuordnen ist. RCMV wurde aus der Wanderratte *Rattus norvegicus* isoliert und stellt, so wie MCMV (Reddehase et al. 2008), ein Modell-System für HCMV dar (Reddehase 2006). Mit 1 % infizierten Neugeborenen ist HCMV weltweit die häufigste konnatale Virusinfektion und die Primärinfektion immunsupprimierter Personen kann schwere klinische Verlaufsformen annehmen (Sweet 1999).

Bei dem CD200-Gen handelt es sich um ein Zelloberflächenmolekül das von verschiedenen Zellen exprimiert wird und Bindungspartner für den CD200-Rezeptor (CD200R) mit inhibitorischer Funktion ist (Wright et al. 2003). Für das RCMV CD200-Gen konnte als Bindungspartner der CD200-Rezeptor der Ratte identifiziert werden (Foster-Cuevas et al. 2011). Da dieser u.a. von Makrophagen exprimiert wird und die Untersuchung anderer viraler CD200-Homologe gezeigt hat, dass die Interaktion mit CD200R zu einer Herabregulierung der Makrophagenaktivität führt (Foster-Cuevas et al. 2004, Cameron et al. 2005, Zhang et al. 2009), soll in der vorliegenden Arbeit für RCMV CD200 ebenfalls die Frage nach einer Beeinflussung der Immunantwort auf die virale Infektion beantwortet werden. Zelluläre Gene, die in ein virales Genom internalisiert worden sind und möglicherweise immunomodulatorische Funktion besitzen sind deshalb von Interesse, weil sie zum einen wertvolle Hinweise über die Infektionspathogenese liefern können, und andererseits ein möglicher therapeutischer Nutzen von ihnen ausgeht (Sarangi et al. 2008).

1 Literaturübersicht

1.1 Einteilung der Herpesviren

Herpesviren sind behüllte Viren mit einem doppelsträngigen, linearen DNA-Genom (124-230 kb), das mit einem ikosaedrischen Kapsid assoziiert ist. Die Virionen haben einen Durchmesser von 150 bis 200 nm, bestehen aus insgesamt mehr als 30 Strukturproteinen und werden von einer Lipid-Doppelmembran umgeben, in die Glykoproteine eingelagert sind. Hauptcharakteristikum dieser Virusfamilie ist ihre Fähigkeit, nach der Infektion latent im Organismus zu verbleiben. Herpesviren persistieren lebenslang im Wirts-Organismus; kommt es zu einer Reaktivierung der Viren, kann dies mit oder ohne Ausbildung klinischer Symptome erfolgen.

Die Familie der Herpesviren wird in drei Unterfamilien, die α -, β -, und γ -*Herpesvirinae*, eingeteilt. Diese Unterteilung beruhte ursprünglich auf rein biologischen Merkmalen wie Zelltropismus, Vermehrungseigenschaften und Pathogenität. Heute werden zunehmend genetische Aspekte berücksichtigt, so dass die Viren anhand ihrer Gene und phylogenetischer Daten eingeordnet werden. Die α -*Herpesvirinae* zeichnen sich durch einen kurzen Replikationszyklus aus und infizieren primär Epithelzellen oraler und genitaler Schleimhäute. α -*Herpesvirinae* umfassen die Genera *Simplex*-, *Varicello*-, *Ilto*- und *Mardivirus* und verbleiben nach der Infektion latent in sensorischen Ganglien. Die β -*Herpesvirinae* weisen ein enges Zellspektrum mit langen Replikationszyklen auf. In infizierten Zellen bilden sich mit Virionen gefüllte zytoplasmatische Einschlüsse, was zu einer deutlichen Vergrößerung der Zellen führt (Zytomegalie) (Macasaet et al. 1975). Nach der Infektion können sie latent in sekretorischen Drüsen und lymphoretikulären Zellen verbleiben. Die Unterfamilie der β -*Herpesvirinae* umfasst die Genera: *Cytomegalo*-, *Muromegalo*-, *Roseolo*- und *Proboscivirus*. Die γ -*Herpesvirinae* weisen ebenfalls ein enges Zellspektrum und lange Replikationszyklen auf. Nach Infektion von B- und T-Lymphozyten verbleiben sie latent in diesen in Form von episomaler DNA (Roizman et al. 1996). Innerhalb der γ -*Herpesvirinae* existieren vier Genera: *Lymphocrypto*-, *Rhadino*-, *Maca*- und *Percavirus*.

1.2 Übersicht der Herpesvirusinfektionen bei Mensch und Tier

Erkrankungen durch Herpesviren gibt es beim Menschen, sowie bei vielen Wirbeltierarten, von Wildtieren über Nutztiere bis hin zu Haustieren. Neben den humanpathogenen Vertretern dieser Virusfamilie kennt man zurzeit mehr als 100 Herpesvirus-Spezies mit tierischen Wirten. Die tierpathogenen Vertreter verursachen ein breites Spektrum an Erkrankungen von unterschiedlicher klinischer und wirtschaftlicher Bedeutung. Tab. 1 gibt eine Übersicht über die charakteristischen Vertreter der Herpesviren beim Mensch und beim Tier.

Tab. 1: Übersicht der charakteristischen Vertreter der Herpesviren bei Mensch und Tier

Unterfamilie	Genus	Mensch	Tier
<i>α-Herpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i>	Herpes-Simplex-Virus 1 (HHV-1) Herpes-Simplex-Virus 2 (HHV-2)	Bovines-Herpesvirus 2 (BHV-2) Herpes-B-Virus (Monkey B Virus)
	<i>Varicellovirus</i>	Varicella-Zoster-Virus (HHV-3)	Suid Herpesvirus 1 (SHV-1) (Aujeszky/ Pseudorabiesvirus) Virus der infektiösen Rhinotracheitis des Rindes (BHV-1) Equines Herpesvirus 1 und 4 (EHV-1 und EHV-4) Felines Herpesvirus (FHV-1) Canines Herpesvirus (CHV-1)
<i>β-Herpesvirinae</i>	<i>Cytomegalovirus</i>	Humanes Cytomegalovirus (HHV-5)	
	<i>Muromegalovirus</i>	Murid herpesvirus -1,-2	Murines Cytomegalovirus (MCMV) Ratten-Cytomegalovirus (RCMV)
	<i>Roseolovirus</i>	HHV-6 HHV-7	
	<i>Proboscivirus</i>		Elefanten-Herpesvirus 1 (EEHV-1)
<i>γ-Herpesvirinae</i>	<i>Lymphocryptovirus (LCV)</i>	Epstein-Barr-Virus (HHV-4)	~ 50 verschiedene Primaten LCV's
	<i>Rhadinovirus</i>	Kaposi Sarkom-assoziiertes Herpesvirus (HHV-8)	Bovines Herpesvirus 4 (BoHV-4)
	<i>Percavirus</i>		Equines Herpesvirus 2 und 5 (EHV-2 und EHV-5)
	<i>Macavirus</i>		Bösartiges Katarrhalfieber des Rindes (OvHV-2 und AIHV-1)

Die den α -*Herpesvirinae* zugehörigen Simplex- und Varicelloviren verursachen Infektionen der Haut, was sich in der typischen Erscheinung in Form von Hautbläschen zeigt. In der Veterinärmedizin spielen die Viren des Genus *Varicellovirus* eine große Rolle, da sie eine Vielzahl verschiedener Tierarten infizieren und dabei Erkrankungen von hoher klinischer und auch wirtschaftlicher Relevanz verursachen können. So führt eine Infektion mit dem Aujeszky-Virus (SHV-1) bei Schweinen zu einer schnellen Durchseuchung des Betriebes und massiven Ferkel-Verlusten für den Tierhalter. Die Erkrankung zählt zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen und neben Schweinen können nahezu alle Säugetiere erkranken, für die eine Infektion mit diesem Virus häufig tödlich verläuft. Primaten und Menschen sind jedoch nicht für das Virus empfänglich. Weltweit verbreitet sind die bei den Equiden vorkommenden Viren equines Herpesvirus 1 (EHV-1) und equines Herpesvirus 4 (EHV-4). EHV-4 konnte vor allem bei respiratorischen Erkrankungen von Pferden nachgewiesen werden, während EHV-1 ein bedeutsamer Abort-Erreger ist und auch zu Hirnhautentzündung führen kann. Antikörper gegen das EHV-1 konnten außerdem bei frei lebenden Wildequiden (*Equus zebra*) nachgewiesen werden (Borchers et al. 1997).

Die Unterfamilie der β -*Herpesvirinae* unterteilt sich in die Genera *Cytomegalo*-, *Muromegalo*-, *Roseolo*- und *Proboscivirus*. Zum Genus *Roseolovirus* gehören das humane Herpesvirus 6 und 7 (HHV-6, HHV-7). HHV-6 kann bei Kindern sehr hohes Fieber und Hautausschläge verursachen (Yamanishi et al. 1988). In der Veterinärmedizin gewann die Unterfamilie der β -*Herpesvirinae* erst in den letzten Jahren eine immer größere Bedeutung. So konnte das erst kürzlich beschriebene Elefanten-Herpesvirus 1 (EEHV-1) aufgrund phylogenetischer Analysen den β -*Herpesvirinae* zugeordnet werden. Das Virus wurde in Läsionen gesunder Afrikanischer Elefanten gefunden, ein pathogenes Potential des Virus für diese Tiere konnte jedoch noch nicht nachgewiesen werden. In Zoologischen Gärten, in denen der Afrikanische Elefant zusammen mit dem Asiatischen Elefanten gehalten wird, kann es zu einer Übertragung des Virus auf den Asiatischen Elefanten kommen. Die Infektion führt bei Asiatischen Elefanten zu schweren hämorrhagischen Erkrankungen, die häufig einen letalen Verlauf nehmen (Ehlers et al. 2006). Bei Schweinen konnte ein weiteres β -Herpesvirus (Suid herpesvirus 2) isoliert werden, dass noch keine Zuordnung erhalten hat. Das Virus wird mit Erkrankungen bei immunsupprimierten Tieren assoziiert. Es kommt, insbesondere bei neugeborenen Ferkeln, zu entzündlichen Prozessen im Bereich der Nase (sog. Einschlusskörperchen-Rhinitis), deren Folge Kurzatmigkeit und Appetitlosigkeit sind. Es gibt auch eine generalisierte Form dieser Erkrankung, so kann es nach intrauteriner Infektion zu einer Mumifikation der Feten, Fruchtresorption oder auch Abort kommen (Heinritzi et al. 2006). Die Morbidität der Erkrankung beträgt 100 %, die Letalität ist umso

höher, je früher die Tiere infiziert wurden (Edington et al. 1976). Es gibt Hinweise auf CMV bei Primaten (Ehlers, unveröffentlichte Daten), die dort mit dem Auftreten von Krankheitssymptomen bei immunsupprimierten Tieren in Zusammenhang gebracht werden.

Viele bedeutende Erkrankungen bei Mensch und Tier werden durch Viren der Unterfamilie der *γ-Herpesvirinae* ausgelöst. Die Primärinfektion mit dem zu den Lymphocryptoviren gehörenden Epstein-Barr Virus (EBV) verläuft weitgehend asymptomatisch, es kann jedoch auch zum Ausbruch der infektiösen Mononukleose kommen (Pfeiffersches Drüsenfieber). Im asiatischen Raum gilt die EBV-Infektion als Risikofaktor für das Nasopharynx-Karzinom, im afrikanischen Raum für das Burkitt-Lymphom. Das Hodgkin-Lymphom, dessen Entstehung ebenfalls in den Zusammenhang mit einer vorausgegangenen EBV-Infektion gebracht wird, ist weltweit verbreitet (Andersson-Anvret et al. 1977; Takada et al. 2001). Zum Genus *Rhadinovirus* zählt das im Jahr 1994 identifizierte humane Herpesvirus 8 (HHV-8 oder auch Kaposi Sarkom-assoziiertes Herpesvirus, KSHV), welches in Zellen des humanen Kaposi Sarkoms, einer bei AIDS-Patienten auftretenden Tumorerkrankung, nachgewiesen wurde (Chang et al. 1994). Ein Virus dieser Gruppe, das in der Veterinärmedizin besonders große Bedeutung hat, ist der Erreger des Bösartigen Katharralfiebers. In Europa wird diese Erkrankung durch das ovine Herpesvirus 2 (OvHV-2) ausgelöst und kommt bei Rindern jeden Alters und jeder Rasse vor. Diese Erkrankung ist, sofern sie mit dem eng verwandten alcelaphinen Herpesvirus 1 (AIHV-1) assoziiert ist, weltweit verbreitet und geht mit schweren Schleimhaut-Ulzerationen einher (Russell et al. 2009). Dieser Gruppe sind außerdem noch verschiedene Affen- und Nagerviren zuzuordnen, sowie viele andere kürzlich identifizierte Lymphocryptoviren (Ehlers et al. 2008).

1.3 Cytomegaloviren

Der Name Cytomegalovirus (CMV) leitet sich aus dem Griechischen (*kytos* „Zelle“, *megas* „groß“) ab und erklärt sich durch die mikroskopisch erkennbare Zellvergrößerung infizierter Zellen. Charakteristisch sind außerdem die DNA-haltigen, intranukleären Einschlusskörperchen, weswegen die infizierten Zellen auch Eulenaugenzellen genannt werden. Viren durchlaufen eine gemeinsame Evolution mit ihren Wirtsorganismen, die zu einer spezifischen Anpassung der Viren an ihren jeweiligen Wirt führt. Infolge dessen zeigen Cytomegaloviren eine ausgeprägte Speziespezifität. Sie vermehren sich nur in Zellen der eigenen oder einer eng verwandten Wirtsspezies. Das humane CMV (HCMV) wurde erstmals von Margaret Gladys Smith aus der Speicheldrüse und den Nieren eines Kindes isoliert (Smith 1956). Noch vor dieser Entdeckung wurde das murine Cytomegalovirus

(MCMV) aus den Speicheldrüsenzellen der Hausmaus (*Mus musculus*) isoliert (Smith 1954). 1969 gelang auch die Isolierung des Cytomegalovirus der Ratte (RCMV) (Rabson et al. 1969).

Die Seroprävalenz von HCMV ist weltweit unterschiedlich und an die sozioökonomischen Faktoren der jeweiligen Region gekoppelt (Britt 1996). In den westlichen Industrieländern liegt die Seroprävalenz bei über 35-jährigen zwischen 40 % und 60 %, während in Teilen Ostafrikas über 95 % der Menschen infiziert sind. In der deutschen Bevölkerung beträgt die CMV-Seroprävalenz bei Schwangeren etwa 50 % (Enders 2003). Mit 1 % infizierten Neugeborenen ist HCMV weltweit die häufigste konnatale Virusinfektion. Die Primärinfektion verläuft in immunkompetenten Personen meist symptomarm. Im Gegensatz dazu kann die Primärinfektion in immunsupprimierten Personen ein schwerwiegendes Krankheitsbild zur Folge haben, die mit Schädigungen der Leber, des Gehirns, der Retina und der Lunge einhergehen (Sweet 1999).

1.3.1 Das Ratten-Cytomegalovirus (RCMV)

Wie bereits erwähnt weisen Cytomegaloviren eine ausgeprägte Speziesspezifität auf. RCMV und MCMV mit ihren Wirten Maus und Ratte werden als Modellsysteme für die HCMV-Infektion benutzt, da Ähnlichkeiten zwischen HCMV und RCMV/MCMV in der Virus-Wirt-Interaktion und Pathogenese bestehen (Reddehase et al. 2006, Reddehase et al. 2008). Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, die Infektionsmechanismen des Virus und die Wirkung antiviraler Substanzen *in vivo* an Tieren zu untersuchen, was beim Menschen aus ethischen Gesichtspunkten nicht möglich ist.

Es sind zwei RCMV-Isolate bekannt: das RCMV-England (RCMV-E) und das RCMV-Maastricht (RCMV-M). Eine Teilsequenzierung des RCMV-E Genoms und der Vergleich mit dem korrespondierenden Genomabschnitt in RCMV-M zeigte, dass es sich bei den beiden RCMV-Isolaten um unterschiedliche Viren handelt (Voigt et al. 2005). Das Genom des RCMV-E hat eine Größe von etwa 205 kb, das Genom des RCMV-M, des humanen und des murinen CMV weisen eine Größe von ca. 230 kb auf (Burns et al. 1988, Vink et al. 2000, Rawlinson et al. 1996). Das Genom des RCMV-E ist somit deutlich kleiner als die Genome von MCMV und HCMV, und weist konservierte Regionen im zentralen Genom-Bereich, aber Unterschiede an den Termini im Vergleich zu MCMV und HCMV auf. Genomfragmente des RCMV-E wurden mithilfe des Computerprogramms DNASTar auf offene Leserahmen (ORF) untersucht und diese wurden mit dem Programm Blast X auf Homologien überprüft. Am linken Terminus des RCMV-E wurde ein C-Typ-Lektin-ähnliches Gen identifiziert, dessen

Protein-Sequenz Homologie zu Rezeptorproteinen auf Natürlichen Killer-Zellen besitzt (Voigt et al. 2001, Voigt et al. 2007). Des Weiteren konnte in einem RCMV-E Genomfragment ein Gen mit Homologie zu dem CD200-Gen der Ratte gefunden werden (Voigt et al. 2005).

1.3.2 CD200 und die Interaktion mit dem CD200-Rezeptor (CD200R)

CD200 gehört zu den Zelloberflächenmolekülen. Diese werden von verschiedenen Zellen des Immunsystems exprimiert und in ein „cluster of differentiation“ mit einer CD-Nummer eingeordnet. Zurzeit sind 350 Zelloberflächenmoleküle beschrieben, wobei sich die Anzahl durch die Entdeckung weiterer Moleküle ständig erhöht (Zola et al. 2007).

CD200 ist der Immunglobulinsuperfamilie (IgSF) zuzuordnen, deren Mitglieder alle einen Immunglobulin-ähnlichen Aufbau zeigen. CD200 besitzt zwei IgSF-Domänen und eine Transmembrandomäne. Die variable Domäne des CD200 befindet sich am N-Terminus, die konstante Domäne am C-Terminus, eine Struktur, die charakteristisch für Proteine ist, die Zell-Zell-Interaktionen vermitteln (Preston et al. 1997). Das CD200-Gen wurde u.a. in Menschen, Mäusen und Ratten gefunden. CD200 wird auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert, bei Ratten vor allem auf Thymozyten, aktivierten T-Zellen, B-Zellen, Dendritischen Zellen, Endothelzellen, neuronalen Zellen und einigen glatten Muskelzellen (Wright et al. 2001).

CD200 ist ein Bindungspartner für einen Rezeptor mit inhibitorischer Funktion, der als CD200R bezeichnet wird (Wright et al. 2003). CD200R ist dem CD200 strukturell sehr ähnlich. Er weist wie CD200 zwei IgSF-Domänen sowie eine Transmembrandomäne auf. Die Transmembrandomäne ist bei dem Rezeptor (67 bp) allerdings deutlich größer als bei CD200 (19 bp) und besitzt in der cytoplasmatischen Region drei konservierte Tyrosinreste, die phosphoryliert werden können. Der Rezeptor wird überwiegend von myeloiden Zellen exprimiert und konnte u.a. auf Makrophagen, Mikroglia, Dendritischen Zellen, neutrophilen, eosinophilen Granulozyten und Mastzellen gefunden werden (Wright et al. 2000). Die Steuerung myeloider Zellen kann sowohl über sezernierte Moleküle, als auch über Zell-Zell-Kontakt reguliert werden.

Das Gen des humanen und murinen CD200R ist auf dem gleichen Chromosom wie das CD200-Gen lokalisiert, was mögliche Rückschlüsse auf eine Entstehung des CD200R durch Gen-Duplikation zulässt (Wright et al. 2003). Der Membran-distal gelegene Tyrosinrest des Rezeptors ist in einem NPXY-Motiv lokalisiert. Phosphorylierte NPXY-Motive binden an Phosphotyrosin-bindende-Domänen auf Signal-Adapter-Molekülen (Shinohara 2005). Dies ermöglicht eine Signalweiterleitung ins Zellinnere durch den CD200-Rezeptor nach Bindung

an CD200. Die Bindung von CD200 der Maus an CD200R konnte durch ein rekombinant hergestelltes CD200-Protein, gekoppelt an fluoreszierende beads, identifiziert werden (Hatherley et al. 2004). Gleiches konnte für die Interaktion des humanen CD200 und seinen Rezeptor gezeigt werden (Wright et al. 2003). Auch eine Bindung des CD200 der Ratte an den CD200R auf aus Ratten isolierten peritonealen Exsudatzellen wurde gezeigt (Foster-Cuevas et al. 2011).

Im Maus CD200 *knock out*-Modell konnte ein inhibitorischer Effekt der CD200/CD200R-Interaktion auf Makrophagen nachgewiesen werden (Barclay et al. 2002). Eine Deletion des CD200-Gens bei Mäusen resultiert in einer Dysregulation von myeloiden Zellen und einer gesteigerten Empfänglichkeit für die „experimental autoimmune encephalitis“ (EAE), die ein Modell für autoimmun-entzündliche Prozesse ist, sowie für die „collagen-induced arthritis“ (CIA) (Hoek et al. 2000). Ferner konnte gezeigt werden, dass CD200 knock out Mäuse im Vergleich zu den Kontroll-Tieren eine Dysregulation myeloider Zellen und eine erhöhte Anfälligkeit für die „experimental autoimmune uveoretinitis“ (EAU) aufweisen (Copland et al. 2007). Bei der EAU handelt es sich um ein Modell für Autoimmunerkrankungen, bei der Gewebeschäden durch eine erhöhte Nitrit-Produktion und somit eine gesteigerte Aktivität der Makrophagen ausgelöst werden.

1.3.3 Das RCMV-CD200 Homolog

Im Laufe ihrer Evolution haben Viren Mechanismen entwickelt, das Immunsystem ihres Wirtes zu manipulieren. Dazu haben sie eine Reihe verschiedener Gene aus dem Wirtsgenom internalisiert, die dem Virus eine Umgehung des Immunsystems des jeweiligen Wirtes ermöglichen und deshalb als immunomodulatorische Gene bezeichnet werden. Die Mechanismen einer solchen Manipulation können sehr unterschiedlich sein und reichen von einer Verhinderung des programmierten Zelltods (Apoptose) bis zur Ausschüttung antiinflammatorisch wirkender Interleukine oder einer Ausbildung von Rezeptoranaloga (Alcami et al. 2000). So wurden auch im RCMV-E Genom homologe Gene identifiziert u.a. das bereits erwähnte RCMV CD200-Homolog (Voigt et al. 2005).

Das RCMV CD200-Homolog (vCD200) ist im ORF 127 des RCMV-Genoms lokalisiert, wird 24 Stunden nach einer Infektion mit RCMV exprimiert und weist im Vergleich mit dem CD200-Gen der Ratte eine Identität von 63 % und eine Similarität von 70 % auf. Es ist ein Typ 1 Transmembranprotein und hat eine Länge von 284 Aminosäuren. Auf Aminosäureebene bestehen zwischen dem vCD200 und dem humanen CD200 eine Identität von 69 % und eine Similarität von 79 %. Das vCD200 besitzt eine N-terminale variable

Domäne und eine etwa gleich große konstante Domäne am C-Terminus (Voigt et al. 2005) und ähnelt somit im Aufbau dem CD200-Gen der Ratte. Es wurden für das vCD200 Bindungsanalysen mit einem hergestellten Fusionsprotein durchgeführt, bei denen gezeigt werden konnte, dass vCD200 an den CD200-Rezeptor (CD200R) der Ratte bindet. In diesen Untersuchungen zur Bindungskinetik wurde festgestellt, dass vCD200, im Vergleich zum CD200-Gen der Ratte, mit der gleichen Affinität an den CD200R bindet (Foster-Cuevas et al. 2011).

Bei RCMV-M, dem murinen und dem humanen Cytomegalovirus wurde bislang kein CD200-Homolog identifiziert.

1.3.4 Virale CD200-Homologe

Virale CD200-Homologe wurden bei verschiedenen Viren (s. Tab. 2) gefunden, was auf die Bedeutung dieses Gens hinweist.

Tab. 2: Übersicht der viralen CD200-Homologe

Familie	Unterfamilie	Name des Gens	Spezies
<i>Herpesviridae</i>	<i>β-Herpesvirinae</i>	U85	HHV-6 (Gompels et al. 1995)
		U85	HHV-7 (Nicholas 1996)
		e127	RCMV (Voigt et al. 2005)
	<i>γ-Herpesvirinae</i>	K14	HHV-8/ KSHV (Russo et al. 1996)
		R15	RRV (Langlais et al. 2006)
<i>Poxviridae</i>	<i>Chordopoxvirinae</i>	M141R	Leporipoxvirus myxomatosis (Cameron et al. 1999)
		YLDV 141R	Yaba-like disease virus (Lee et al. 2001)
<i>Adenoviridae</i>	<i>Atadenovirinae</i>	ORF 4	Duck Adenovirus 1 (Hess et al. 1997)

Der Aufbau der viralen CD200-Homologe zwischen den Virus-Familien unterscheidet sich. Die bei den Herpesviridae auftretenden Homologe weisen zwei extrazelluläre IgSF-Domänen und eine Transmembranregion auf. Im Gegensatz dazu findet man bei den Homologen der Poxviridae eine einzelne IgSF-Domäne (Cameron et al. 2005).

Einige virale CD200-Homologe wurden bereits funktionell untersucht. Für das CD200-Homolog des Myxoma Virus (Gen M141R) konnte eine verstärkte Expression von iNOS bei Infektion mit einer vCD200-Deletionsmutante in der Milz, den poplitealen Lymphknoten und der Primärläsion histologisch gezeigt werden (Cameron et al. 2005). Das zytosolische

Enzym induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) wird von aktivierten Makrophagen vermehrt produziert, führt zu einer gesteigerten Stickoxid-Produktion im Gewebe und verbessert so die Immunantwort des Körpers auf eine Infektion, da weitere Entzündungszellen aus dem umliegenden Gewebe rekrutiert werden. Der Mechanismus einer iNOS-Inhibierung stellt somit einen Vorteil für das Virus dar. In dieser Studie wurde ebenfalls die T-Zell-Aktivierung in den regionalen Lymphknoten untersucht. Dazu wurde ein monoklonaler CD25-Antikörper eingesetzt, der einen Teil des Interleukin-II-Rezeptors erkennt. Nur aktivierte Lymphozyten exprimieren diesen Rezeptor, und sieben Tage nach einer Infektion mit der vCD200-Deletionsmutante (Δ M141R) konnte eine Zunahme der CD25-positiven Zellen in den Lymphknoten mithilfe der Immunfluoreszenz beobachtet werden (Cameron et al. 2005). In einer weiteren *in vitro*-Studie zur Untersuchung des M141-Proteins wurde eine Hochregulierung der iNOS- und TNF- α -Aktivität bei Infektion von murinen myeloiden Zellen mit Δ M141R gefunden (Zhang et al. 2009). Das K14 Protein des HHV-8 ist ein weiteres virales CD200-Homolog. In *in vitro* Studien zu diesem Protein zeigte sich eine verringerte Aktivierung humaner Makrophagen, wenn diese in einer co-Kultur mit CHO-Zellen (chinese hamster ovary cells) inkubiert wurden, die das K14 Protein oder CD200 exprimierten. Die verringerte Aktivierung der humanen Makrophagen durch die Interaktion von CD200 und dem CD200-Rezeptor wurde anhand einer verringerten Tumornekrose-Faktor (TNF- α) Sekretion der Makrophagen festgestellt (Foster-Cuevas et al. 2004). Aktivierte Makrophagen steigern die Expression von CD40- und TNF-Rezeptoren und sezernieren TNF- α . *In-vitro* Studien zum vCD200-Homolog R15 des Rhesus Rhadinovirus (RRV) zeigten, dass von einer humanen monozytischen Zelllinie abstammende Makrophagen, die mit einem vCD200-Fusionsprotein inkubiert wurden, eine verringerte Transkription von TNF aufweisen, was ebenfalls auf eine verringerte Aktivität von Makrophagen durch die vCD200/CD200R-Interaktion schließen lässt (Langlais et al. 2006). Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des RCMV-E CD200-Homologs.

1.4 Hypothese

In der Hypothese der vorliegenden Arbeit wird davon ausgegangen, dass durch die Expression des viralen Liganden (vCD200) auf der Oberfläche von RCMV- infizierten Zellen eine Inhibierung der Makrophagen durch den CD200-Rezeptor (CD200R) erfolgt. Die Inhibierung führt zu einer verminderten Aktivierung des Enzyms iNOS, wodurch die Stickoxid-Produktion im umliegenden Gewebe reduziert wird. Die daraus resultierende verringerte Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe erleichtert die Vermehrung des Virus im Wirtsorganismus.

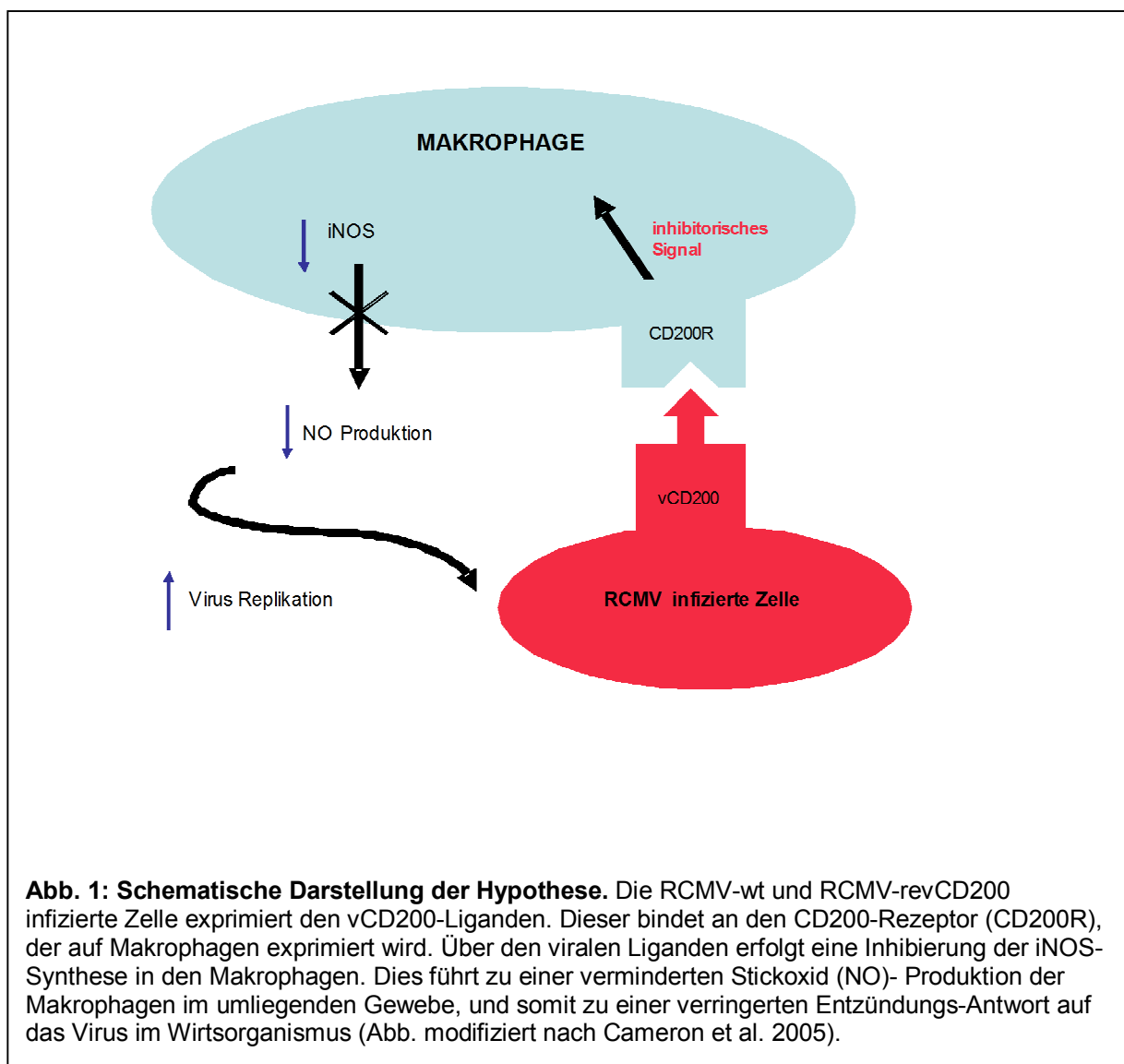


Abb. 1: Schematische Darstellung der Hypothese. Die RCMV-wt und RCMV-revCD200 infizierte Zelle exprimiert den vCD200-Liganden. Dieser bindet an den CD200-Rezeptor (CD200R), der auf Makrophagen exprimiert wird. Über den viralen Liganden erfolgt eine Inhibierung der iNOS-Synthese in den Makrophagen. Dies führt zu einer verminderten Stickoxid (NO)-Produktion der Makrophagen im umliegenden Gewebe, und somit zu einer verringerten Entzündungs-Antwort auf das Virus im Wirtsorganismus (Abb. modifiziert nach Cameron et al. 2005).

1.5 Zielsetzung

Herstellung und Charakterisierung einer RCMV CD200-Revertante

Um auszuschließen, dass bei der homologen Rekombination im Rahmen der Herstellung der RCMV-vCD200-Deletionsmutante (RCMV- Δ CD200) unerwünschte Mutationen innerhalb des RCMV-Genoms auftraten, die für einen veränderten Phänotyp verantwortlich sind, wurde eine RCMV-vCD200-Revertante (RCMV-revCD200) hergestellt. Eine Revertante gleicht dem RCMV Wildtyp-Virus (RCMV-wt) und dient dazu, Veränderungen des Infektionsverhaltens von RCMV- Δ CD200 auf den *knock-out* des vCD200-Gens zurückführen zu können. Die RCMV-revCD200 wurde durch homologe Rekombination hergestellt, mit Hilfe von Restriktionsanalysen, Southern Blot und Sequenzierung charakterisiert und in ihren Wachstums-Eigenschaften mit RCMV-wt und RCMV- Δ CD200 verglichen.

Analyse der iNOS-Expression nach vCD200/CD200R-Interaktion

In der Hypothese der vorliegenden Arbeit wurde die Inhibierung der Makrophagen-Aktivierung über den CD200-Rezeptor (CD200R) durch Expression des vCD200 auf RCMV infizierten Zellen postuliert. Die Expression der Gene vCD200, CD200R und iNOS sollte zunächst *in vitro* nachgewiesen werden. Dazu wurden Rattenembryofibroblasten (REF), eine Makrophagenzelllinie sowie peritoneale Exsudatzellen (PEZ) verwendet. Die Expression von iNOS als Makrophagen-Aktivierungsmarker sowie die Expression der Gene vCD200 und CD200R wurde vor und nach Virusinfektion untersucht. Um einen inhibitorischen Effekt der vCD200/CD200R-Interaktion *in vitro* nachzuweisen, wurden Makrophagen/REF co-Kulturen mit den oben genannten Viren infiziert und die iNOS Expression im Western Blot untersucht.

Untersuchung des Aktivierungszustandes von peritonealen Exsudatzellen und Milzgewebe nach Infektion

Gewebematerial wurde aus mit den oben genannten Viren infizierten und mock-infizierten Ratten gewonnen. Aus dem Peritoneum isolierte Makrophagen wurden in der Durchflusszytometrie analysiert, wobei durch Betrachtung des Enzyms iNOS Erkenntnisse über den Aktivierungszustand peritonealer Makrophagen am Infektionsort gewonnen werden konnten. Aus Milz und PEZ wurde DNA und RNA isoliert, um im Anschluss die Transkription der viralen Gene vCD200 und Glykoprotein B (gB), sowie der zellulären Gene c-myc, iNOS, CD200 und CD200R mithilfe der TaqMan-PCR zu untersuchen. Im Anschluss erfolgt ein Virusnachweis in den Organen Leber und Milz bei infizierten Tieren durch Virustitration mithilfe von Plaque-Assays.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Software

Programm	Hersteller
Lasergene	DNASTAR, Madison, USA
MS Office	Microsoft, Redmond, USA
MX Pro 4.01	Stratagene, La Jolla, USA
Nanodrop	PeQLab, Erlangen, D
CellQuest Pro	Becton Dickinson, San Jose, USA
FlowJo	FlowJo, Ashland, USA
MacVector 8.0	MacVector, Inc., Cary, USA
OligoPerfect	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D

2.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
AEC (3-amino-9-Ethylcarbazol) -Tablette	Sigma-Aldrich, München, D
Agar	Roth, Karlsruhe, D
Agarose	Roth, Karlsruhe, D
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München, D
APS (Ammoniumpersulfat)	RheinPerChemie, Rheinfelden, D
Bidestilliertes Wasser (ddH ₂ O)	Eppendorf AG, Hamburg, D
(+)-Biotin N-succinimidylester (Biotin-NHS)	Sigma-Aldrich, München D
BSA (Bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich, München D
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth, Karlsruhe, D
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Ethanol	Roth, Karlsruhe, D
FKS (Fötales Kälberserum)	PAN GmbH, Aidenbach, D
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe, D
L- Glutamin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Glycin	Roth, Karlsruhe, D
GelRed	Biotium Inc., Hayward, USA
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe, D
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, D
Methanol	Roth, Karlsruhe, D
Methylbutan	Roth, Karlsruhe, D
Methylenblaupulver	Roth, Karlsruhe, D
Magermilchpulver	Heirler Cenovis, Radolfzell, D
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe, D
Natriumazid	Roth, Karlsruhe, D
10 x PCR Puffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Penicillin/Streptomycin-Lösung	PAN GmbH, Aidenbach, D
TEMED (N, N, N', N-Tetramethylethylendiamin)	Roth, Karlsruhe, D

Tris (Trihydroxymethylendiamin)	Roth, Karlsruhe, D
Tween 20	Roth, Karlsruhe, D
Saponin	Roth, Karlsruhe, D
X-Gal	Roth, Karlsruhe, D

2.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät	Hersteller
ABI PRISM TM Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City, USA
Autoklav	H + P Labortechnik, Oberschleissheim, D
Bio-Rad Bradford Proteinassay	Bio-Rad, München, D
Blotting Apparatur (Turbo Blotter)	Schleicher & Schuell, Einbek, D
Brutschrank	Heraeus, Hanau, D
CSPD ready-to-use	Roche, Mannheim, D
Digitalkamera	Nikon, Düsseldorf, D
DNA Molekulargewichtsstandard (100bp/1kb Gene ruler)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
DNA Molecular Weight Marker III	Roche, Mannheim, D
Durchflusszytometer (FACSCalibur)	BD Bioscience, Heidelberg, D
Elektroporationsgerät (Gene-Pulser), Küvetten	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Entwickler für Röntgenfilme (Curix 60)	Agfa, Köln, D
Filterpapier	Schleicher & Schuell, Einbek, D
Geldokumentationssystem	INTAS, Göttingen, D
Gelelektrophoresekammer	Biometra, Göttingen, D
Gelkammer (SDS-Gelelektrophorese)	Hoefer Scientific, San Francisco, USA
Glaswaren (Kolben, Bechergläser, Messzylinder)	Schott, Mainz, D
Homogenisator	Hartenstein, Würzburg, D
Homogenisator (Fast Prep)	Thermo, Hamburg, D
Horizontalschüttler	Biometra, Göttingen, D
Kryoröhrchen	Roth, Karlsruhe, D
Membranen - Immobilon TM -P Transfer-Membran (Western Blot) - Nylonmembran Roti-Nylon (Southern Blot)	Millipore, Billerica, USA Roth, Karlsruhe, D
Mikroskop (Axiovert 200)	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe, D
Nanodrop Spectrophotometer	Kühn & Bayer, Nidderau, D
Objekträger (Polysine TM)	Menzel Gläser GmbH, D
Petrischalen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Pipetten (2; 10; 20; 100; 200; 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, D
Polyallomerröhrchen	Beckman, München, D
Protein-Längenstandard (Caleidoscope Precision Plus)	Bio-Rad, D
Röntgenfilm (XBA blauempfindlich)	Fotochemische Werke GmbH, D
Rundwell-Mikrotiterplatte (96-well)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Sephadex Gelfiltrationssäule (G-25)	Amersham Biosciences, Freiburg, D
Schüttler für Bakterienkulturen	Heraeus, Osterode, D
Spektrophotometer (Ultraspec 2000)	Pharmacia Biotech, Uppsala, S
Spannungsgeräte	Biometra, Göttingen, D
Stratagene MX 3005	Stratagene, La Jolla, USA
Thermocycler T Gradient	Biometra, Göttingen, D
Eppendorf Mastercycler EP Gradient	Eppendorf, Hamburg, D
Tissue Tec	Tissue Tec, Sakura, USA
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
UV-Stratalinker 2400	Stratagene, La Jolla, USA
Vakuumpumpe	Heraeus, Osterode, D
Vortex	GFL, Burgwedel, D

Wasserbäder	Thermo, Hamburg, D
Zellkulturflaschen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturplatten	Nunc, Roskilde, DK
Zellsieb ZS 70	Hartenstein, Würzburg, D
Zelltrichter (Doppel Cytofunnel)	Thermo, Hamburg, D
Zentrifugen - Biofuge Fresco, Biofuge Stratos - SpeedVac-Zentrifuge - Sorvall RC 5C-Zentrifuge - L8-M Ultrazentrifuge - Shandon Cytospin 4 Zentrifuge	Heraeus, Osterode, D Savant, Hicksville, USA Thermo, Hamburg, D Beckman, München, D Thermo, Hamburg, D
Zentrifugengefäße - Polyallomerröhrchen - Zentrifugengefäße „Falkon“ (15ml, 50ml)	Beckman, München, D BD Biosciences, Heidelberg, D

2.1.4 Enzyme

Enzym	Hersteller
DNase 1	Qiagen, Hilden, D
Nitrat Reduktase	Roche, Mannheim, D
Phusion DNA Polymerase	Finnzymes, Espoo, FIN
Platinum Taq DNA Polymerase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Proteinase K	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Restriktionsenzyme (<i>HindIII</i> , <i>EcoRI</i> und <i>SacI</i>)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
RNase A	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
Revert Aid H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories, Pasching, AUT

Die Enzymreaktionen wurden in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffersystem inkubiert.

2.1.5 Puffer und Lösungen

Die im Folgenden angegebenen Puffer wurden, soweit nicht anders erwähnt, mit bidestilliertem Wasser angesetzt. Alle Prozentangaben sind Volumenprozentangaben.

Blockpuffer (Western Blot)	5	%	Magermilchpulver
	0.1	%	Tween, in PBS geben
Detektionspuffer (Southern Blot)	0.1	M	NaCl
	0.1	M	Tris-HCl
DNA-Load-Mix	70	Teile	70% Sukrose
	5	Teile	Bromphenolblau
Erythrozyten-Lyse-Puffer	1.1	%	Na ₄ Cl in H ₂ O (Lsg. A)
	0.17	M	TrisHCl in H ₂ O (Lsg. B), A:B → 9:1
10 x Fc-Block	1	mg/ml	Anti CD16 / CD32
	0.5	mg/ml	Ratten IgG
FACS-Puffer	12.5	ml	FKS
	2.5	ml	20mM NaN ₃
	ad 500	ml	PBS
Färbelösung (X-Gal-Assay)	1	M	NaH ₂ PO ₄
	50	mM	K ₃ Fe(CN) ₆
	0.1	M	MgCl
	0.25	%	X-Gal
Fixierlösung (X-Gal-Assay)	4	%	Paraformaldehyd
	0.1	M	NaHPO ₄
	0.1	%	Glutaraldehyd

2 x HeBS-Puffer	280	mM	NaCl
	50	mM	HEPES
	1.5	mM	Na ₂ HPO ₄
10 x Laufpuffer (Western Blot)	0.25	M	Tris
	1.92	M	Glycin
	1	%	SDS
Lysis-Puffer	150	mM	NaCl
	50	mM	Tris
	1	%	NP-40
	0.1	%	SDS; vor Benutzung des Puffers 1 Tabl. Protease-Inhibitor (Roche, D) zugeben
Maleinsäurepuffer (Southern Blot)	0.1	M	Maleinsäure
	0.15	M	NaCl; pH 7.5 mit NaOH (fest) einstellen
Methylcellulose	4	g	Methylcellulose
	ad 250	ml	H ₂ O; im Anschluss autoklavieren, dann:
	250	ml	2 x MEM
	5	%	FKS
	1	%	Penicillin/ Streptomycin
	1	%	L-Glutamin
6 x Orange Dye (DNA-Ladepuffer)	10	mM	Tris-HCl (pH 7.6)
	0.15	%	Orange G
	0.03	%	Xylencyanol FF
	60	Mm	EDTA
PBS-Puffer	140	mM	NaCl
	2	mM	KCl
	10	mM	Na ₂ HPO ₄
	2	mM	KH ₂ PO ₄
PC9-Puffer	8	ml	Chloroform
	6	ml	Phenol (wassergesättigt)
	4	ml	TE9-Puffer
Probenpuffer (2 x PAGE)	250	mM	Tris-HCl (pH 6.8)
	4	%	SDS
	20	%	Glycerin
	5	%	Mercaptoethanol
	0.002	%	Bromphenolblau
Sammelgel-Puffer (SDS-Gel)	0.5	M	Tris-HCl (pH 6.8)
20 x SSC (Southern Blot)	3	M	NaCl
	0.3	M	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇
	ad 2	l	H ₂ O ; pH 7 einstellen mit NaOH
10 x TBE	1	M	Tris
	0.9	M	Borsäure
	10	mM	EDTA (pH 8.4)
TE-Puffer	10	mM	Tris-HCl (pH 8.3)
	0.1	mM	EDTA
TE9-Puffer (pH 9)	500	mM	Tris
	20	mM	EDTA
	10	mM	NaCl
Transfer-Puffer (Western Blot)	300	mM	Tris-HCl (pH 6.8)
	28.3	g	Glycin
	250	ml	Methanol; ad 250 ml H ₂ O
Trenngel-Puffer (SDS-Gel)	1.5	M	Tris-HCl (pH 7)
Trypanblaulösung	0.25	%	Typanblau (Serva, D) in PBS, sterilfiltriert
VSB-Puffer (Virusstandardpuffer)	50	mM	Tris-HCl (pH 7.8)
	10	mM	KCl
	5	mM	EDTA

2.1.6 Antikörper

Tab. 3: Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
Streptavidin-APC	Gegen Biotin gerichtet	eBioscience, San Diego, USA
Avidin-FITC	Gegen Biotin gerichtet	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD200R-bio	Gegen den CD200-Rezeptor der Ratte gerichtet, biotinyliert	Neil Barclay, Oxford, UK
OX2-bio	Gegen den vCD200-Ligand gerichtet, monoklonal, biotinyliert	Neil Barclay, Oxford, UK
iNOS/NOS Type II	Monoklonal, gegen iNOS gerichtet, verwendet für Western Blot und Immunhistochemie	BD Transduction Laboratories, Heidelberg, D
iNOS/NOS Type II	Polyklonal, aus Kaninchen, gegen iNOS gerichtet, verwendet in der Durchflusszytometrie	BD Transduction Laboratories, Heidelberg, D
MHC II RT1 B, Alexa Fluor 488 konjugiert	Monoklonal, aus Maus, gegen MHCII der Ratte gerichtet	AbD Serotec, Düsseldorf, D
CD172a, R.phykoerythrin konjugiert	Monoklonal, aus Maus, gegen CD172a der Ratte gerichtet	AbD Serotec, Düsseldorf, D
IgG, Peroxidase konjugiert	Polyklonal, aus Ziege, erkennt den H&L-Bereich des Maus IgG, Sekundärantikörper	Dako, Hamburg, D
IgG, Alexa Fluor 488 konjugiert	Polyklonal, aus Ziege, erkennt den H&L-Bereich des Kaninchen IgG, Sekundärantikörper	MoBiTec, Göttingen, D

2.1.7 Zelllinien und Medien

Zelllinie	Herkunft
Rattenembryofibroblasten (REF)	Burns, Barbour et al. 1988
Makrophagenzelllinie NR 8383	ATCC (CRL 2192), Manassas, USA

Als Medium für beide Zelllinien wurde DMEM verwendet. DMEM-Pulver für 10 l wurde mit 37 g NaHCO₃ versetzt und auf 10 l mit ddH₂O aufgefüllt. Im Anschluss wurde der pH-Wert von 7.2 mit HCl eingestellt. Für die verwendeten Zelllinien Makrophagen und REF wurde das Medium wie folgt frisch komplettiert: DMEM + 10 % FKS + 1 % Penicillin/Streptomycin (10 000 U/ml) + 2 mM Glutamin.

2.1.8 Bakterienstämme und Bakterienmedien

Für die Versuche wurden die elektrokompetenten *E.coli* DH10B der Firma Invitrogen verwendet.

Medium	Zusammensetzung		
LB-Flüssigmedium	1	%	Bacto/Trypton
	0.5	%	Bacto Yeast Extrakt
	1	%	NaCl, pH 7,5 mit NaOH einstellen
LB-Festmedium, LB-Flüssigmedium plus	1.5	%	Agar

Für die Blau-Weiß Selektion nach TOPO-Klonierungen wurden dem Medium nach dem Autoklavieren 70 µg/ml Ampicillin, IPTG (0.2 mM) und X-Gal (40 µg/ml) zugesetzt.

2.1.9 Plasmide

Tab. 4: Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Referenz
TOPO-CD200	Doktorarbeit Tina Westerholt
TOPO-CD200R	Doktorarbeit Tina Westerholt
TOPO-vCD200	Doktorarbeit Tina Westerholt
TOPO-iNOS	Doktorarbeit Tina Westerholt
TOPO-gB	Voigt, Mesci et al. 2007
TOPO-c-myc	Voigt, Mesci et al. 2007

2.1.10 Kits

Kit	Hersteller
Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination	Sigma-Aldrich, München, D
First Strand cDNA Synthesis- Fermentas Revert AID-Minus-MuLV Reverse Transkriptase-Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe, D
ABI PRISM™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
ECL Western Blotting detection reagents	GE Healthcare, Chalfort St. Giles, UK
DIG High Prime DNA Labeling & Detection Starter Kit II	Roche, Grenzach-Wyhlen, D
QIAquick Gel extraction Kit	Qiagen, Hilden, D
RNase free DNase Set	Qiagen, Hilden, D
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, D
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden, D
QIAprep Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, D
TURBO DNA-free Kit	Applied Biosystems, USA

2.1.11 Oligonukleotide und TaqMan-Sonden

Die Sequenzen für die Primer-Gestaltung wurden in der NCBI Datenbank recherchiert, die Primer wurden im Anschluss mithilfe der Software OligoPerfect ausgewählt und wurden entsalzt und lyophilisiert von der Firma Invitrogen bezogen. Sie wurden auf eine Endkonzentration von 10 μ M eingestellt und bei -20 °C gelagert. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tab. 5 dargestellt. Die TaqMan-Sonden vCD200 und CD200 wurden von der Firma Applied Biosystems, USA bezogen, die Sonden für die Gene c-myc, iNOS, CD200R und Glykoprotein B (gB) stammen von der Firma TIB Molbiol, D. Die verwendeten Sonden (s. Tab. 6), sowie die für die TaqMan-PCR benötigten Primer (s. Tab. 5, Nr. 1-12) wurden dankenswerterweise von Dr. A. Nitsche (Robert Koch-Institut) entworfen.

Tab. 5: Verwendete Primer

Nummer/ Name	Wirt/ Virus	Sequenz (5' → 3')	Nukleotide
1. Rat CD200R F	Ratte	GCTACACAGAGAAGAGCAATCCAC	24
2. Rat CD200R R		CATTGACTTTGCCTTGTGACG	21
3. RCMV CD200 F1	RCMV	CTACGAAGGTTACCAGCGTGT	21
4. RCMV CD200 R1		TCCAATACAGTAAAGCTATCACCG	24
5. Rat CD200 F	Ratte	CAGGTTTTATACTTGGGGAATG	22
6. Rat CD200 R		GTGCCGTTTCCAGTATAATAAGAT	24
7. Rat iNOS F	Ratte	AGCTGGGCTGTGCAAACC	18
8. Rat iNOS R		TGCAATGTTTGCTTCGAACATC	22
9. RCMV gB F	RCMV	CAAGGCCATCAGAACGGATC	20
10. RCMV gB R		TCACTCCCCGATGCGTTATA	20
11. c-myc F	Ratte	GCCAGAGGAGGAACGAGCT	20
12. c-myc R		GGGCCTTTTCATTGTTTTCCA	21
13. CD200 F	Ratte	TCTGTCACCAGCATCCTCC	19
14. CD200 R		TTATTTCAATCTTTGCATCCCC	22
15. OX2 cap1	RCMV	CGGAGCTATGAACGTCGTTAT	21
16. ie2 nesp1		GACGATATCCATATCTCAAAT	21
17. LJ 124 (F)	RCMV	CACAAC TAGTCAATCACAATCAGA	24
18. RCMV OX2 Hind R		TAAC TTAGGACACAACGGAAC	21
19. Rat N OX-2 receptor Fwd	Ratte	ATGGGGATTGTGTCGCTAAG	20
20. Rat N OX-2 receptor Rev		CTGCAGCCACTGATTTTCAA	20
21. Rat N CD200 antigen Fwd	Ratte	TGCTACTGTTCCGCTGATTG	20
22. Rat N CD200 antigen Rev		GGATTCAGAATGGCCTCAA	20
23. RCMV ox-2 xho f	RCMV	CATCTCGAGATGAATTTAATGTTTACTA	30

Tab. 6: Verwendete TaqMan Sonden

Nummer/ Name	Wirt/ Virus	Sequenz (5' → 3')	Nukleotide
I. c-myc-Sonde	FAM	FAM-TGCCCTGCGTGACCAGATCC-TAMRA	20-mer
II. RCMV gB-Sonde	FAM	FAM-CACAAACGTTGCGGTCAGACTTTTCGAC-TAMRA	28-mer
III. CD200R-Sonde	FAM	FAM-CTATGATACTGTGACCACGACGGAGGCAC-BBQ	30-mer
IV. iNOS-Sonde	FAM	FAM-AACGTCTCACAGGCTGCCCGGA-BHQ	22-mer
V. RCMV CD200-Sonde	FAM	FAM-ATCCAACACCTCCAACAT	18-mer
VI. Rat CD200-Sonde	VIC	VIC-ACTACAAGCAGAGTCT	17-mer

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Sowohl die Rattenembryofibroblasten (REF) als auch die Makrophagenzelllinie NR 8383 wurden im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % inkubiert. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 175 cm² gehalten. Als Kulturmedium wurde DMEM unter Zusatz von 10% fötalem Kälber-Serum (FKS), 1 % Penicillin/Streptomycin und 1% L-Glutamin verwendet. Alle zwei Tage wurden die Zellen passagiert. Nach Absaugen des Kulturmediums wurden die Zellen zunächst einmal mit PBS gespült und anschließend mit einer Trypsinlösung überschichtet. Nach zweiminütiger Inkubationszeit bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt im Brutschrank, wurden die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert, im Verhältnis 1:10 (REF) und 1:5 (Makrophagen) verdünnt, und in eine neue Zellkulturflasche überführt.

2.2.2 Zellzahlbestimmung mithilfe der Neubauerkammer

Es wurden 10 µl trypsinierte Zellen in 90 µl Trypanblaulösung aufgenommen. Von dieser Suspension wurden 10 µl zwischen Deckglas und Neubauerkammer gegeben. Lebende Zellen erscheinen unter dem Mikroskop farblos, tote Zellen aufgrund der defekten Zellwand und der dadurch erfolgten Anfärbung des Cytoplasmas blau. Gezählt wurden nur die lebenden Zellen in den vier Großquadranten der Kammer. Der erhaltene Wert wurde anschließend durch vier dividiert. Für jede Zellzahlbestimmung wurden zwei Zählungen

durchgeführt, deren Werte gemittelt wurden. Durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor 10 und der Kammergröße 10^4 wurde die Zellzahl pro ml bestimmt.

2.2.3 Präparation eines Virusstocks

Für die Präparation von Virusstocks in T175-Zellkulturflaschen wurden etwa 80 % konfluente REF mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 0.5 in einem Volumen von 10 ml infiziert. Während der ersten Stunde nach Infektion wurden die Flaschen alle 10 min geschwenkt, um eine optimale Verteilung der Viren auf den Zellen zu erreichen. Eine Stunde nach Infektion wurde das Medium auf 25 ml aufgefüllt. Nach fünf bis sieben Tagen waren alle Zellen infiziert und wurden mit einem Zellschaber abgenommen. Zellen und Überstand wurden für 20 min bei $6\,000 \times g$ und $4\text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Zentrifugenbecher überführt. Das Pellet wurde in 5 ml des Überstandes resuspendiert und mit einem bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ vorgekühlten Glas-Homogenisator homogenisiert. Das homogenisierte Pellet wurde bei $17\,000 \times g$ und $4\text{ }^\circ\text{C}$ für 20 min zentrifugiert, um größere Zelltrümmer aus dem virushaltigen Überstand zu entfernen. Die Überstände beider Zentrifugationen wurden vereinigt und bei $27\,000 \times g$ und $4\text{ }^\circ\text{C}$ für 3 h zentrifugiert. Für die bisher beschriebenen Zentrifugationsschritte wurde eine Sorvall RC 5C-Zentrifuge (Rotor Sorvall Type GSA) verwendet. Der Überstand wurde bis auf 5 ml verworfen, und das Virus enthaltende Pellet wurde über Nacht auf Eis bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde das Pellet resuspendiert und mit einem bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ vorgekühlten Douncer homogenisiert. Zur Entfernung kleinerer Zelltrümmer wurden Polyallomerröhrchen mit 15 % D(+)-Saccharose/VSB-Puffer präpariert, die dann mit der Viruslösung überschichtet und in einer L8-M Ultrazentrifuge (Rotor SW-28) für 3 h bei $140\,000 \times g$ und $4\text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen, während das virushaltige Pellet in 2,5 ml VSB-Puffer resuspendiert und aliquotiert wurde. Um die temperaturbedingte Virusinaktivierung auf ein Minimum zu reduzieren, erfolgte die Viruspräparation auf Eis.

Um eine Bakterien-Kontamination des Virusstocks auszuschließen wurden 3 μl des Virusstock in 100 ml LB-Medium bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht schüttelnd inkubiert.

2.2.4 Präparation viraler DNA

In Zellkulturflaschen gehaltene REF wurden bei einer Konfluenz von ca. 80 % mit dem Virus (MOI 0.5) infiziert. Betrug der zytopathische Effekt 100 %, wurden die Flaschen bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Das Einfrieren und anschließende Auftauen der Flaschen führte zu einem Zellaufschluss. Nach dem Auftauen wurden die Zellen abgeschabt und die Zelltrümmer für

10 min bei 7500 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 90 min bei 14 000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das entstandene virushaltige Pellet wurde in 20 µl 0.2 % FKS, 100 µl DNase I (100 µg/ml) und 100 µl RNase A (100 µg/ml) in einem Endvolumen von 10 ml ddH₂O resuspendiert und bei 37 °C für 15 min inkubiert. Hierbei wird zelluläre DNA und RNA verdaut, während die virale DNA durch das Capsid geschützt ist. Nach anschließender Zentrifugation für 90 min bei 16000 rpm und Raumtemperatur wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 3 ml TE9/Proteinase K Puffer gelöst und 2 h bei 55 °C inkubiert. Alternativ war eine Inkubation bei 37°C über Nacht möglich. Es folgte die Zugabe von 3 ml PC9-Puffer und Zentrifugation für 5 min bei 4 000 rpm und Raumtemperatur. Die wässrige Oberphase wurde abgenommen und das Volumen gemessen. Zur Fällung wurden 0.1 Volumen 3 M Na-Acetat sowie 2.5 Volumen eiskaltes 100 % Ethanol dazu gegeben. Die Lösung wurde für 20 min bei 15 000 rpm und 4 °C zentrifugiert, das Pellet anschließend je nach Größe in etwa 150 µl ddH₂O gelöst und die Konzentration durch Messung der optischen Dichte (OD₂₆₀) ermittelt. Für Zentrifugationen bis 10000 rpm wurde eine Sorvall RC 5C-Zentrifuge (Rotor Sorvall Type GSA), für Zentrifugationen ab 10000 rpm eine L8-M Ultrazentrifuge (Rotor SW-28) verwendet.

2.2.5 Co-Transfektion eukaryotischer Zellen mit CaHPO₄

Ziel der Methode war die Herstellung einer RCMV CD200-Revertante (RCMV-revCD200) durch homologe Rekombination. REF sind adhärente Zellen, die sich effizient mit der CaHPO₄-Präzipitationsmethode (Graham et al. 1973) transfizieren lassen. Dabei wird ein CaHPO₄-DNA-Präzipitat von der Zelle mittels Endozytose aufgenommen.

In einer Sechs-Loch-Platte wurden 1x10⁶ REF, die von Sprague-Dawley Ratten stammen, pro Kavität ausgesät und in 10 % DMEM-Medium für 24 h inkubiert. Lag am folgenden Tag eine Konfluenz der Zellen von ca. 80 % vor, wurde das Medium erneuert und die Zellen wurden anschließend co-transfiziert. Dazu wurde zunächst der Vektor (pSK bluescript), in den das RCMV *HindIII* J-Fragment inseriert vorliegt, mit dem Enzym *SacI* linearisiert und es entsteht ein Fragment mit homologen Flanken, die für eine erfolgreiche Rekombination der DNA entscheidend sind. Das entstandene Fragment mit homologen Flanken wurde anschließend auf ein Gel aufgetragen um die Linearisierung anhand der Größe der sichtbaren Bande im Vergleich zum nicht linearisierten Vektor zu überprüfen.

Eine RCMV CD200-Deletionsmutante (RCMV-ΔCD200) lag in der Arbeitsgruppe bereits vor. Der linearisierte Vektor mit homologen Flanken und RCMV-ΔCD200 Virion-DNA wurden vor der Transfektion durch Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt und mittels Ethanol gefällt,

um eine Konzentrierung der DNA zu erreichen. Die DNA-haltige Lösung dazu wurde mit dem gleichen Volumen an Phenol-Chloroform versetzt und für 5 min bei 4000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde abgenommen, das Volumen gemessen und 0.1 Volumen 3 M Na-Acetat sowie 2.5 Volumen eiskaltes 100 % Ethanol zur Fällung dazu gegeben. Die Lösung wurde für 20 min bei 15 000 rpm und 4 °C zentrifugiert und das getrocknete Pellet je nach Größe in etwa 100 µl ddH₂O gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

Für die Transfektion wurden verschiedene DNA-Mengen eingesetzt (4-16 µg) und mit 90 µl sterilfiltriertem 2,5 M CaCl₂ in einem Gesamtvolumen von 900 µl mit ddH₂O vereint und auf einem Reagenzglasschüttler tropfenweise zu dem im Reagenzglas enthaltenen 900 µl des 2 x HeBS (HEPES buffered saline)-Puffers gegeben. Während des nun folgenden zwanzigminütigen Inkubationsschrittes bei Raumtemperatur bildete sich ein Präzipitat aus, welches langsam tropfend auf die REF-Zellen gegeben wurde. Anschließend wurden die Zellen für ca. 12 h und nach erneutem Mediumwechsel für insgesamt 48 h im Brutschrank kultiviert. Das Klonierungsschema ist in Abb.3 dargestellt.

2.2.6 Isolierung der vCD200-Virusrevertante

Zur Isolierung des rekombinanten Virus wurden serielle Verdünnungen und β-Galaktosidase-Färbungen durchgeführt. Dabei wird die β-Galaktosidase-Reportergen-Aktivität eines eingefügten *lacZ*-Leserahmens durch Umsetzung des Substrates X-Gal als Selektionsmarker verwendet. Diejenigen Zellen, in denen aus Plasmid und Virion-DNA das rekombinante Virus (RCMV-revCD200) entstand, enthielten das *lacZ*-Gen nicht mehr, sondern an dieser Stelle wieder das vCD200-Gen des RCMV Wildtyp-Virus (RCMT-wt). Dies ermöglichte eine Unterscheidung der RCMV-revCD200 von der Deletionsmutante RCMV-ΔCD200, da letztere aufgrund des eingefügten *lacZ*-Gens eine Blaufärbung der Plaques nach β-Galaktosidase-Färbung zeigte.

Die virushaltigen Überstände der co-Transfektion wurden nach Bildung von Plaques abgenommen, die entsprechenden Kavitäten erneut mit Medium gefüllt und der gewonnene Überstand auf neue REF gegeben. Diese Zellen wurden in 96-Loch-Platten ausgelegt und 1 h mit 50 µl Überstand pro Kavität inkubiert. Danach wurde die Kavität mit 2 % DMEM auf 0.5 ml aufgefüllt. Nachdem sich Plaques gebildet hatten, wurden die Überstände dieser Kavitäten in neue Platten überführt und die Platte mit den Plaques wurde mit X-Gal gefärbt. Für die Färbung wurden die Zellen zunächst mit der Fixierlösung für 10 min bei Raumtemperatur fixiert und dann 2 x mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die

Färbelösung auf die Zellen gegeben und die Platten wurden für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Färbelösung wurde entfernt und die Platten wurden zum Trocknen bei Raumtemperatur aufgestellt. Das in RCMV-ΔCD200 eingefügte *lacZ*-Gen ist in der Lage, X-Gal zu hydrolysieren. Diese Reaktion ist an der blauen Färbung der oxidierten Hydrolyseprodukte zu erkennen. Die Zellen, die mit dem mutierten Virus infiziert waren, erschienen nach einer Färbung mit X-Gal also blau, solche, die mit dem rekombinanten Virus infiziert waren, weiß. Durch dieses Auswahlverfahren konnten blaue und weiße Plaque-bildende Zellen unterschieden werden. Das durch homologe Rekombination in der co-Transfektion hergestellte rekombinante Virus RCMV-revCD200 konnte auf diese Weise vom RCMV-ΔCD200 getrennt werden. Nur die Überstände von Kavitäten mit überwiegend weißen Plaques wurden zu weiteren Verdünnungen verwendet. Die Überstände dieser Kavitäten wurden auf REF in 96-Loch-Platten gegeben und so lange weiterverdünnt, bis nur noch ein weißer Plaque pro Kavität erkennbar war. Diese Überstände wurden dann zunächst auf Zellen in einer 48-Loch-Platte gegeben, dann auf Zellen einer 24-Loch-Platte, 12-Loch-Platte und schließlich einer Sechs-Loch-Platte. So konnten größere Mengen Überstand gewonnen, und eine erneute Verdünnung und Wiederanzucht der Überstände auf Zellen vorgenommen werden (doppelte Plaque Purifikation), um eine größere Reinheit des Überstandes zu gewährleisten. Bei jeder Platte wurde nach der Abnahme der Überstände eine X-Gal-Färbung vorgenommen, um etwaige Blaufärbungen der Plaques zu erkennen. Der nun doppelt aufgereinigte Überstand der ausschließlich weißen Plaques wurde schließlich auf Zellen in einer Kulturflasche gegeben und es wurde Virion-DNA hergestellt. Mit dieser konnte anschließend ein Verdau mit Restriktionsendonukleasen angefertigt werden, um das isolierte rekombinante Virus in seinem Restriktionsmuster mit RCMV-wt zu vergleichen.

2.2.7 Bestimmung des Virustiters

Die Ermittlung des Virustiters erfolgte in einer vierfachen Bestimmung und in zwei Ansätzen, die parallel durchgeführt wurden. Dafür mussten 5 x 10⁴ REF/Kavität einer 24-Loch-Platte ausgesät und über Nacht in 10 % Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert werden. Zur Bestimmung des Virusstock-Titers wurde das Virus von 1 x 10⁻¹ bis 1 x 10⁻⁸ verdünnt. Bei der Titration von Organen zur Bestimmung der Virusmenge wurden diese zunächst homogenisiert, indem sie durch ein Zellsieb gepresst wurden. Die homogenisierten Organe wurden dann auf die Zellen gegeben. Nach Entfernung des Mediums aus den Kavitäten wurden je 200 µl pro Kavität der Verdünnungsstufen 1 x 10⁻³ bis 1 x 10⁻⁸ des Virusstocks auf die Zellen gegeben, bzw. eine definierte Menge (1 g) des homogenisierten Organs, und für 1

h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde zur Reduktion der freien Diffusion der Viruspartikel 1 ml Methylcellulosemedium je Kavität zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von sieben Tagen bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde die Methylcellulose abgesaugt, die Zellen zweimal mit je 1 ml 1 % Paraformaldehyd in PBS gewaschen und anschließend für 1 h bei Raumtemperatur mit 1 ml einer 0.4 % Methylenblaulösung angefärbt. Die Lösung wurde entfernt und die Platten über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Plaques ausgezählt und der Virustiter in *Plaque Forming Units (PFU)* bestimmt, wobei davon ausgegangen wurde, dass ein einzelner Plaque einem infektiösen Viruspartikel entspricht. Die PFU/ml wurde nach folgender Formel berechnet: **PFU/ml = Anzahl der Plaques x 5 x Verdünnungsfaktor**

Die Zellen wurden für den gleichen Versuch auch stets mit der gleichen MOI infiziert, um eine Wiederholbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Da die MOI in Abhängigkeit vom Versuch (eingesetzte Zellzahl, benötigte MOI, Virustiter) variiert, ist ausgehend vom Virustiter das Volumen der einzusetzenden Menge an Virus für den jeweiligen Versuch bestimmt worden: **V Virus (ml) = (Zellzahl x MOI) / Virustiter (PFU/ml)**

2.2.8 Wachstumskurven

Um das Wachstumsverhalten des hergestellten rekombinanten Virus RCMV-revCD200 mit dem Wildtyp-Virus (RCMV-wt) und RCMV-ΔCD200 zu vergleichen, wurden Wachstumskurven dieser drei Viren angefertigt. Dazu wurden REF in einer Sechs-Loch-Platte ausgelegt und 24 h später mit hoher (5) und niedriger (0.01) MOI in einem Gesamtvolumen von 0.5 ml DMEM 2 % für eine Stunde infiziert. Danach wurden die Kavitäten dreimal mit PBS gewaschen, um sämtliches nicht absorbiertes Virus zu entfernen. Der Versuchsansatz wurde dreifach durchgeführt. Nach einer Stunde wurden die Kavitäten mit DMEM 2 % auf 3 ml aufgefüllt. Bei der Infektion mit hoher MOI wurden 4, 24, 36, 48 und 72 Stunden nach Infektion 0.5 ml Überstand abgenommen, bei der Infektion mit niedriger MOI wurden 4, 24, 48, 72, 96, 120 und 168 Stunden nach Infektion die Überstände abgenommen. Nach der Abnahme zum jeweiligen Zeitpunkt wurden die Kavitäten wieder auf 3 ml Flüssigkeit mit DMEM 2 % aufgefüllt. Die abgenommenen Überstände wurden bei -80 °C eingefroren und anschließend titriert. Die Ergebnisse wurden in einer EXCEL-Tabelle zusammengefasst und graphisch dargestellt (s. Abb.7 und Abb.8.).

2.2.9 DNA-Isolierung aus Leber und Milz

Zunächst wurden Organe homogenisiert. Ein Organstück (10-20 mg) wurde in ein mit ca. 15 Keramik-Kügelchen gefülltes Eppendorf-Gefäß mit Schraubverschluss gegeben und für 1 min im Homogenisator homogenisiert. Zur Isolierung der DNA wurde das „DNeasy-Tissue-Kit“ verwendet. Die DNA wurde in 40 µl ddH₂O eluiert und die Konzentration durch das Nanodrop-Gerät bestimmt. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20 °C.

2.2.10 RNA-Isolierung aus Organen

Bei der Isolierung von RNA aus den Organen der Ratten wurden diese zunächst homogenisiert. Ein DNA-Verdau wurde auf der Säule (RNase free DNase Set) vorgenommen und auch nach der Eluierung in Lösung (TURBO DNA-free Kit), um eine Kontamination der RNA mit DNA zu verhindern. Die Konzentration der RNA wurde über die Messung der optischen Dichte (OD₂₃₀) bestimmt. Um eine schnelle Degradierung der RNA zu verhindern, wurde unter RNase-freien Bedingungen gearbeitet. Isolierte RNA wurde bei -80 °C gelagert und bei Gebrauch stets auf Eis aufgetaut und dort während des Experimentes belassen.

2.2.11 Herstellung von cDNA

Zur cDNA-Synthese wurde das First Strand cDNA Synthesis- Fermentas Revert AID Minus-MuLV Reverse Transkriptase-Kit verwendet. Die RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase, RT) ist in der Lage, aus RNA als Matrize einen komplementären DNA-Strang zu synthetisieren. Es wurde von jeder cDNA eine Kontrolle (im folgenden als _{minus}RT bezeichnet) mitgeführt, bei der die RT nicht zugegeben wurde, um eine Kontamination der cDNA mit DNA ausschließen zu können. Das Pipettierschema ist wie im Protokoll des Kits angegeben durchgeführt worden (s. Tab. 7).

Tab. 7: Pipettierschema cDNA-Synthese

Reagenz	Konzentration	Endkonzentration
RNA	photometrisch bestimmt	0.1 ng- 5 µg
RT-Puffer	5 x	1 x
dNTP-Lösung	10 mM each	0,5 mM
DTT	0,1 M	5 mM
Random Primer	25 µM	2,5 µM
RNasin	40 U / µl	1 U / µl
MuLV-RT H ⁻	200 U / µl	125 U / Ansatz

Zu jedem Ansatz wurde RNA gegeben deren Konzentration vorher photomerisch bestimmt wurde (s. 2.2.10), und im Anschluss wurde die cDNA-Synthese im Thermocycler nach dem

in Tab. 8 dargestellten Protokoll durchgeführt. Die einzelnen Reagenzien wurden dabei schrittweise zugegeben.

Tab. 8: PCR-Programm Drei-Schritt cDNA-Synthese

Temperatur	Zeit
70 °C	5 min
37 °C	5 min
42 °C	60 min
70 °C	10 min
4 °C	∞

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Ein-Schritt-PCR zur Herstellung der cDNA etabliert (s. Tab. 9). Dazu wurden alle in Tab. 7 aufgeführten Reagenzien gleichzeitig und nicht schrittweise in das PCR-Gefäß gegeben. Die Effektivität der cDNA Synthese im Vergleich zur oben aufgeführten Drei-Schritt-PCR wurde mit der quantitativen PCR (TaqMan-PCR) überprüft. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

Tab. 9: PCR-Programm Ein-Schritt cDNA-Synthese

Temperatur	Zeit
37 °C	5 min
42 °C	60 min
70 °C	10 min
4 °C	∞

2.2.12 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mithilfe der PCR werden DNA-Fragmente amplifiziert, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit dann einerseits für später durchzuführende TaqMan-PCRs in TOPO kloniert wurden, oder zur Herstellung einer vCD200-Sonde für den Southern Blot benötigt wurden. Folgende Fragmente wurden mit den angegebenen Primern amplifiziert:

DNA-Fragment	Primer (Sequenzen s. Tab. 5)
CD200 (für anschließe TOPO-Klonierung)	Primer Nr. 13 & 14
vCD200 (für anschließe TOPO-Klonierung)	Primer Nr. 15 & 16
CD200R (für anschließe TOPO-Klonierung)	Primer Nr. 19 & 20
iNOS (für anschließe TOPO-Klonierung)	Primer Nr. 7 & 8
vCD200 (für Sonde Southern Blot)	Primer Nr. 17 & 18

Die PCR ist ein Verfahren zur exponentiellen *in vitro* Vermehrung definierter Nukleotidsequenzen (Mullis et al. 1986). Mithilfe von Oligonukleotiden als Startermoleküle werden gezielt DNA-Fragmente zum Klonieren oder Screenen amplifiziert. Die Ansätze für die PCR setzten sich wie in Tab. 10 aufgeführt zusammen. Es wurde zunächst ein Mastermix hergestellt und dann die entsprechenden DNA als Matrize dazugegeben. Eine photometrische Bestimmung der eingesetzten DNA-Menge erfolgte vor der Amplifikation mithilfe des Nanodrop-Gerätes.

Tab. 10: Standard PCR Pipettierschema

Eingesetzte Menge	Reagenz	
50 bis 200 ng	DNA als Matrize	
1 U	Taq Polymerase	
10 mM	dNTP-Mix	
10 mM	5'-Startoligonukleotid	Mastermix
10 mM	3'-Startoligonukleotid	
10 x	PCR-Puffer	
50 mM	MgCl	

Die verwendeten Primer sind in Tab. 5 aufgeführt und die PCR wurde in einem Thermocycler mit einem Standard-PCR-Programm (s. Tab. 11) durchgeführt.

Tab. 11: Standard PCR Programm

Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5	1
Denaturierung	95	1	
Hybridisierung	58	1	30-35
Elongation	72	1	
Finale Elongation	72	7	1
Kühlen	4	∞	

2.2.13 Agarose-Gelelektrophorese

Nach der PCR erfolgte die Auftrennung des PCR-Produktes per Agarose- Gelelektrophorese hinsichtlich des Molekulargewichtes. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Stromstärke und einer Spannung, die je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente bei 50 bis 110 Volt lag. Für einen Virion-DNA-Verdau mit großen Fragmenten betrug die Laufzeit bei 50 V 48 h. Die Auftrennung von kleinen Fragmenten erfolgte bei 70 bis 110 Volt innerhalb von 1 bis 2 h. Je nach Größe der Fragmente wurden zwischen 0.6 und 2 % Agarose in TBE-Puffer durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst und anschließend mit Gel Red, einem DNA-interkalierenden Reagenz, in einer Menge von 5 µl in 100 ml versetzt. Jeder Probe wurden vor dem Auftragen 4 µl DNA-Ladepuffer (Orange Dye) zugegeben. Zur Abschätzung der Fragmentgröße wurde parallel ein DNA-Molekulargewichtsstandard (100 bp DNA-Ladder bzw. 1 kB DNA-Ladder) auf das Gel aufgetragen. Die Detektion der DNA erfolgte mithilfe eines Geldokumentationssystems bei einer Wellenlänge von 254 nm. Zur Dokumentation wurden die Gele unter UV-Bestrahlung fotografiert.

2.2.14 DNA-Eluierung aus Agarosegelen

Zur Eluierung von DNA aus Agarosegelen wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit“ verwendet. Das Prinzip dieses Kits beruht auf der selektiven, quantitativen Adsorption von Nukleinsäuren (bis zu 10 µg) an eine Silicagelmembran bei hohen Salzkonzentrationen.

Zunächst wurde das gewünschte DNA-Fragment unter UV-Licht (254 nm) aus dem Agarosegel geschnitten, in ein Eppendorfgefäß überführt und das Gewicht bestimmt. Pro 100 µg Agarose wurden 500 µl Puffer QC zugegeben. Anschließend wurde das Gelstück bei 50 °C im Heizblock inkubiert, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Die weitere Vorgehensweise entsprach dem Standardprotokoll des Herstellers. Die DNA wurde in 20 bis 40 µl Elutionspuffer oder ddH₂O eluiert, welches zuvor auf 50 °C erhitzt wurde.

2.2.15 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Zur Elektroporation wurden elektrokompetente Zellen des Stammes *E.coli* DH10B benutzt. Elektrokompetente Zellen werden in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet und die Präparation erfolgt salzfrei.

Es wurde eine Vorkultur aus 50 ml LB-Medium und einer Kolonie des Bakterienstammes angeimpft und unter Schütteln über Nacht bei 37 °C inkubiert. 10 ml dieser Vorkultur wurden in 250 ml LB-Medium in einen 1 l Kolben überimpft und die Bakterien wurden schüttelnd bei 37 °C inkubiert. 2 Stunden nach dem Animpfen wurde zum ersten Mal die optische Dichte (OD) der Kultur bei 600 nm bestimmt. Dazu wurde 1 ml LB-Medium in eine Plastikkuvette eingebracht und im Spektrophotometer als Leerwert gemessen, und im Anschluss wurde 1 ml der Bakteriensuspension gemessen. Hatten die Bakterien eine optische Dichte zwischen 0.6-0.65 erreicht, wurde die Bakteriensuspension auf Eis gestellt und alle 5 min geschwenkt. 250 ml der Kultur wurden in einen 500 ml Zentrifugationsbecher überführt und bei 4000 rpm und 4 °C für 10 min in der Sorvall RC 5C-Zentrifuge (Rotor Sorvall Type GSA) pelletiert. Das Zellpellet wurde dann mit 10 ml sterilem Wasser schwenkend resuspendiert und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Dann wurde das Zellpellet erneut mit 75 ml sterilem Wasser schwenkend resuspendiert und unter gleichen Bedingungen pelletiert. Die Überstände wurden jeweils verworfen. Das Zellpellet wurde anschließend durch Schwenken in 10 % Glycerol resuspendiert und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde unter oben genannten Bedingungen pelletiert und in 1.2 ml sterilem 10 % Glycerol resuspendiert. Die Zellen wurden dann in Aliquots á 40 µl aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Sie wurden bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.16 TOPO-Klonierung

Die TOPO-Klonierung wurden zur Herstellung von Vektoren für die TaqMan-PCR verwendet (s. Tab. 4). Das verwendete TOPO-Klonierungs-Kit ermöglicht die ungerichtete Ligation von DNA-Fragmenten mit Adenin-Überhängen in pCR2.1-TOPO. Die Enden dieses linearisierten Vektors sind mit einer Topoisomerase verbunden, welche die Enden des DNA-Fragments und des TOPO-Vektors kovalent miteinander verknüpft. Taq-Polymerasen synthetisieren DNA-Fragmente mit Adenin-Überhängen. Nach der Extraktion eines zu klonierenden Fragments aus dem Agarosegel wurde die Ligation für 5-15 min bei Raumtemperatur durchgeführt.

Tab. 12: Pipettierschema TOPO-Ligation

Reagenz	Volumen
DNA mit Adenin-Überhängen	4 µl
Verdünnte Salzlösung	1 µl
pCR2.1-TOPO	0,5 µl

Die elektrokompenten *E. coli* DH10B Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit 3 µl der Ligation (Pipettierschema s. Tab. 12) gemischt. Nach Elektroporation wurden die Bakterien für 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die elektroporierten Zellen wurden auf ampicillinhaltigen (70 µg / ml) LB-Platten, welche X-Gal-Lösung (40 µg/ ml) und IPTG (0.2 mM) enthielten, ausplattiert.

Die Multiple Cloning Site (MCS) des pCR2.1-TOPO liegt im *lacZ*-Gen, das in der Lage ist, X-Gal zu hydrolysieren. Diese Reaktion ist an der blauen Färbung der oxidierten Hydrolyseprodukte zu erkennen. Nach der Insertion eines Fragments in die MCS ist die *lacZ*-Gensequenz unterbrochen, weshalb Bakterienkolonien, die ein solches Plasmid tragen, weiß erscheinen (Blau-Weiß-Screening).

2.2.17 Reinigung und Isolierung von Plasmid-DNA

Das verwendete Verfahren zur Isolierung von Plasmid-DNA aus der Kultur beruht auf der modifizierten, alkalischen Lyse (Birnboim et al. 1979). Für die Isolierung im kleinen Maßstab wurde das QIAprep Miniprep-Kit verwendet. Die so aufgereinigte Plasmid-DNA kann direkt in einer Sequenzierungsreaktion eingesetzt werden. Das Prinzip ist eine DNA-Präparation durch Adsorption an eine Silicamembran. Zur Amplifikation der Plasmide wurden Über-Nacht-Kulturen von elektroporierten Einzelkolonien angelegt. Dazu wurde eine Einzelkolonie von der selektiven Agarplatte in 5 ml LB-Flüssigmedium, welches ein geeignetes Antibiotikum enthielt (70 µg/ml Ampicillin), resuspendiert. Die Kultur wurde 12–16 h schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Größere Kulturmengen wurden 1:1000 von der über Nacht-

Kultur angeimpft. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (16 000 x g, 1 min, RT für <2 ml Kultur bzw. 6 000 x g, 10 min, 4 °C für größere Volumina) pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet von 2 bis 5 ml Bakterienkultur wurde in 250 µl Puffer P1 resuspendiert, zur Lyse und Denaturierung mit 250 µl Puffer P2 versetzt und Proteine, Zelltrümmer und chromosomale DNA wurden durch Zugabe von 350 µl Puffer N3 gefällt. Nach Zentrifugation (16 000 x g, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand auf eine QIAprep Säule pipettiert und die Plasmid-DNA durch Zentrifugation (16000 x g, 1 min, 4 °C) an die Säule gebunden. Nach zwei Waschschrritten mit 0.5 ml Puffer PB und 750 µl Puffer PE wurde die Säule durch Zentrifugation (16000 x g, 1 min, 4 °C) getrocknet und die Plasmid-DNA in 50 µl HPLC-H₂O eluiert. Alle Zentrifugationsschritte wurden in der Biofuge Fresco-Zentrifuge durchgeführt. Die DNA-Konzentration ist im Anschluss mithilfe eines Nanodrop-Geräts bestimmt worden.

2.2.18 TaqMan-PCR (Real Time PCR)

Bei der TaqMan-PCR handelt es sich um eine Real Time PCR. Diese beruht auf dem gleichen Prinzip wie die herkömmliche PCR, ermöglicht aber zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA. Die Real Time PCR wird mithilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Von *Perkin-Elmer* wurde die quantitative TaqMan-PCR (PE-ABI, TaqMan) eingeführt (Heid et al. 1996; Wittwer et al. 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode zur Quantifizierung von folgenden Genen eingesetzt: CD200, vCD200, CD200R, iNOS, c-myc und Glykoprotein B.

Gen	Verwendete Primer (Sequenzen s. Tab. 5)	Verwendete Sonde (Sequenzen s. Tab.6)
CD200	Primer Nr. 5 & 6	Sonde Nr. VI
vCD200	Primer Nr. 3 & 4	Sonde Nr. V
CD200R	Primer Nr. 1 & 2	Sonde Nr. III
iNOS (s.o)	Primer Nr. 7 & 8	Sonde Nr. IV
gB	Primer Nr. 9 & 10	Sonde Nr. II
c-myc	Primer Nr.11 & 12	Sonde Nr. I

Bei dieser Methode wird zusätzlich zu den 5'- und 3'-Primern eine Oligonukleotid-Sonde benutzt. Die Sonde trägt einen fluoreszierenden Reporter-Farbstoff (z.B. FAM) am 5'-Ende sowie einen Quencher-Farbstoff am 3'-Ende (TaqMan- Sonde). Durch die räumliche Nähe des Reporters und des Quenchers kommt es zu einem sogenannten Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET). Wenn die Taq-Polymerase, die zusätzlich zur Polymeraseaktivität eine 5'-3'-Exonuclease-Aktivität besitzt, die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abbaut, entfernen sich dadurch Quencher und Fluorophor voneinander, und es kann eine steigende Reporter-Fluoreszenz gemessen werden. Die

Messung findet am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt. Das Fluoreszenzsignal steigt mit Amplifikation der DNA an und ist sequenzspezifisch.

Zunächst wurde in der PCR (s. 2.2.12) das jeweilige Fragment des zu detektierenden Gens, an welches die Sonde später binden soll, amplifiziert. Dieses Fragment wurde dann in einen TOPO-Vektor kloniert (s. 2.2.16) und die korrekte Insertion durch Sequenzierung (s. 2.2.21) überprüft. Die genaue Größe des gesamten Plasmides war bekannt, so dass mithilfe des durchschnittlichen Molekulargewichts eines Basenpaares (660 g/mol) und der Avogadrokonstante (6.023×10^{23} 1/mol) das Gesamtgewicht des Plasmides berechnet werden konnte. Die Konzentration der DNA wurde mithilfe eines NanoDrop-Geräts bestimmt. Zusammen mit dem zuvor ermittelten Molekulargewicht konnte dann die Kopienzahl pro μl bestimmt werden.

Für eine Quantifizierung der erhaltenen Messwerte benötigt man eine Standardkurve in einem Bereich von 1×10^6 bis 1×10^0 Kopien/Plasmide. Die Verdünnungsstufen 1×10^6 - 1×10^0 wurden in einer λ -DNA-Lösung hergestellt ($c = 1$ ng/ μl), um den Fehler durch spontane Degradation der DNA zu verringern. Die verwendete DNA-Standardreihe basiert auf Plasmiden, die die jeweils nachzuweisenden RCMV- oder Ratten-Genomabschnitte enthalten. Zusätzlich wurde zu jeder PCR ein sogenanntes "housekeeping"- Gen (*c-myc*), ein Proto-Onkogen, mitgemessen. NTC (non template controls), also Kavitäten ohne DNA, wurden mitgeführt, um eine Kontamination des Mastermix (s. Tab. 10) auszuschließen. Zur Bestimmung der Viruslast der Proben wurde das virale Glykoprotein B-Gen (*gB*) verwendet, das für ein Virushüllprotein kodiert.

Bei den Messungen der Proben wurde das jeweilige Plasmid als Positivkontrolle mitgeführt.

Die Auswertung erfolgte durch die Bestimmung der Kopienzahl des jeweiligen untersuchten Gens „*gene of interest*“ und des „*housekeeping*“-Gens, die miteinander ins Verhältnis gesetzt wurden (*gene of interest/c-myc*). Dadurch wurde ein Wert ermittelt, der unabhängig von der in den Proben enthaltenen DNA-Konzentration ist. Die erhaltenen Messwerte wurden dann entsprechend der Probenzusammensetzung gruppiert, der Mittelwert wurde gebildet und die Standardabweichung ermittelt. Letztere wurde in der graphischen Darstellung als Fehlerbalken aufgetragen. Die erhaltenen Probenwerte wurden in der graphischen Darstellung als logarithmische Werte aufgetragen.

2.2.19 DNA-Restriktionsverdau

Grundlage des Restriktionsverdaus ist die Aktivität der Restriktionsendonukleasen. Dies sind bakterielle Enzyme, die Fremd-DNA, z.B. Phagen-DNA, erkennen, an spezifischen Stellen

schneiden und somit abbauen können. Dabei spalten sie hydrolytisch die Phosphodiesterbindungen beider DNA-Stränge. Restriktionsendonukleasen unterscheiden sich in ihrer Erkennungssequenz, ihrer Spaltstelle und ihrem Ursprungsorganismus. Die Wirts-DNA wird durch Methylierung der Erkennungssequenz vor dem Abbau geschützt.

Es werden drei Typen von Restriktionsenzymen unterschieden, wobei in der vorliegenden Arbeit nur die Restriktionsenzyme *HindIII*, *EcoRI* und *SacI* verwendet wurden, die alle drei zum Restriktionsenzym Typ II gehören und Schnittstellen mit Überhängen schaffen. Die verwendeten Puffer wurden vom Hersteller geliefert. Das Pipettierschema für einen Restriktionsverdau mit *EcoRI* ist Tab. 13 zu entnehmen. Die Restriktion mit *EcoRI* erfolgte für 1 Stunde bei 37°C.

Tab. 13: Pipettierschema für einen Restriktionsverdau mit *EcoRI*

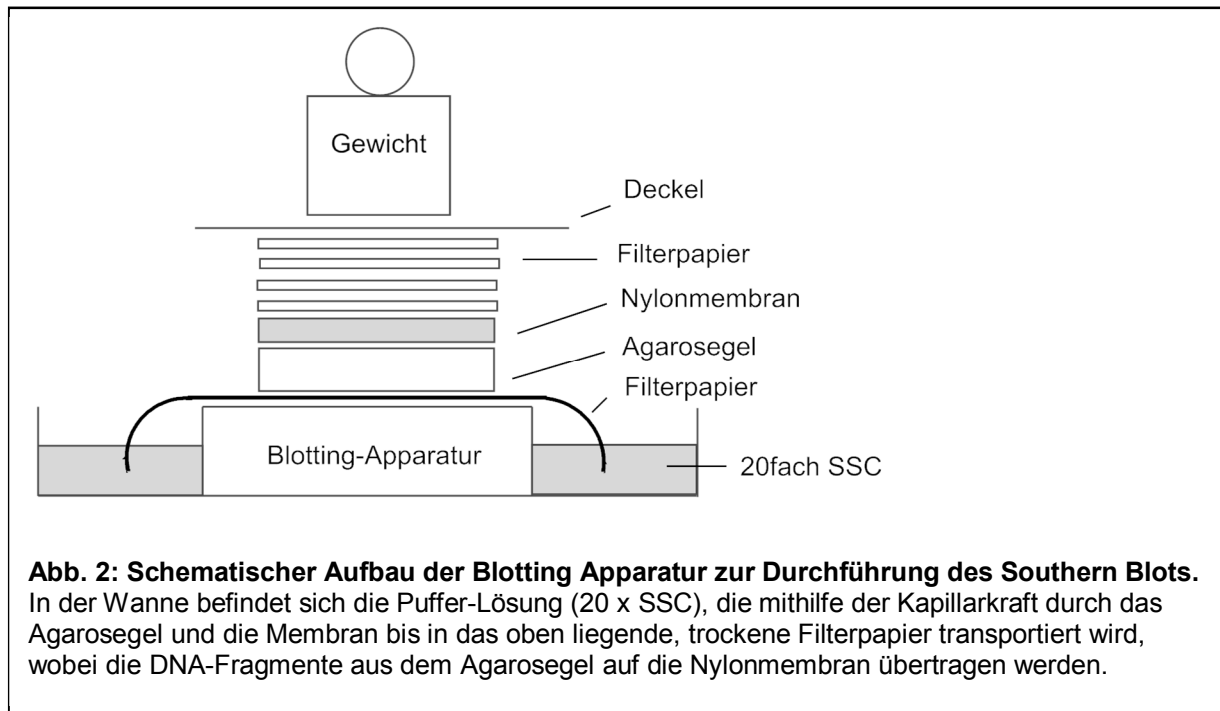
Reagenz	Volumen
DNA	1 µg
<i>EcoRI</i> (10 U/µl)	1 µl
Puffer <i>EcoRI</i>	2 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

2.2.20 Southern Blot

Der Southern Blot ist ein von E. M. Southern (1975) entwickeltes Verfahren, das den Nachweis von DNA-Fragmenten ermöglicht. Das hier verwendete Visualisierungsverfahren der Firma Roche (DIG High Prime DNA Labeling & Detection Starter Kit II) zum Nachweis der DNA basiert auf Lumineszenz. Die DNA wurde mithilfe von Restriktionsendonukleasen (*HindIII*) verdaut und zusammen mit einem 1 kb Molekulargewichtsgrößenstandard auf ein Agarosegel (0.6 %) aufgetragen. Durch Elektrophorese wurden die Fragmente unterschiedlicher Größe getrennt und nach 48 h Laufzeit unter UV- Licht sichtbar gemacht. Die Agarosegele wurden fotografiert und die Bilder digital gespeichert. Zusätzlich zu dem 1 kb Molekulargewichtsgrößenstandard wurde noch ein weiterer Marker (*DNA Molecular Weight Marker III*) auf das Agarosegel aufgetragen, der im Anschluss auf den Blot übertragen wurde.

Nach der Gelelektrophorese wurde das Agarosegel in zehnfach SSC-Puffer denaturiert (30 min). Nach einer Neutralisation in zweifach SSC (30 min) wurde die im Agarosegel enthaltene DNA auf eine Nylonmembran übertragen (*blotting*). Dazu wurde eine Blotting-Apparatur verwendet und das Agarosegel auf Filterpapier gelegt, das Verbindung zu der Puffer-Lösung (20 x SSC) hat. Auf dem Agarosegel liegt zunächst die exakt zugeschnittene

Nylonmembran, die zuvor für 5 min in Transferpuffer (20 x SSC) inkubiert wurde, und



darüber erneut ein Stapel Filterpapier (Aufbau siehe Abb. 2).

In der Regel wurde über Nacht geblottet. Die Membran wurde im Anschluss mit zweifach SSC neutralisiert (5 min), anschließend getrocknet und die DNA durch UV Crosslinking (UV Stratalinker; Programm: *auto crosslink*) quer vernetzt auf der Membran fixiert (2 min *auto crosslink* Programm). Die Quervernetzung erhöht die Stabilität der DNA und ermöglicht so die Aufbewahrung der Membran über einen längeren Zeitraum. Zur Inkubation mit einer spezifischen DNA-Sonde wurde das oben erwähnte DIG (Digoxigenin)-System verwendet. Zunächst wurde die gewünschte Nucleotidsequenz für die Sonde in der PCR amplifiziert, dann für 3 h oder über Nacht mit dem Southern-Marker (DIG-High-Prime) inkubiert. Die DNA wird dabei an Digoxigenin-11-dUTP, ein Steroid-Hapten, gebunden. Es folgte ein Hitzeinaktivierungsschritt, danach wurde der DNA-Marker entweder sofort benutzt oder bei -20 °C gelagert. Vor der Benutzung musste der Marker zur Denaturierung erneut aufgeköcht und dann auf Eis abgekühlt werden. Die Membran wurde zunächst in einer Glas-Drehflasche mit 20 ml Hybridisierungspuffer (DIG Easy Hyb) inkubiert und für 30 min bei 42°C prähybridisiert. Dann wurden 500 ng der DNA-Sonde mit 20 ml Hybridisierungspuffer vermischt und die Membran darin über Nacht in der Glas-Drehflasche mit dem Marker hybridisiert. Am nächsten Tag wurde die Membran zunächst für 2 x 5 min bei 25 °C mit 2 x SSC gewaschen und anschließend bei 68 °C mit 0.1 % SSC und 0.1 % SDS gewaschen (2

x 15 min). Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde die Membran folgendermaßen blockiert: 18 ml Maleinsäurepuffer wurden mit 2 ml Blockierungs-Puffer (DIG-Blocking Solution) vermischt, und die Membran darin für 30 min bei 40 °C inkubiert. Anschließend wurde der Detektions-Antikörper (DIG *Anti-Digoxigenin-AP Conjugate*) mit Blockierungs-Puffer 1:10000 verdünnt, auf die Membran gegeben und dort für 30 min bei 40 °C belassen. Danach folgte ein erneuter Waschschrift (2 x SSC + 0.1 % SDS) von 2 x 15 min bei 40 °C und die Membran wurde dann für 2 x 5 min bei gleicher Temperatur mit dem Detektions-Puffer inkubiert. Beim Wechseln der Substanzen in der Drehflasche war es wichtig, eine Austrocknung der Membran zu verhindern. Schließlich wurde die Membran in eine Röntgen-Kassette eingelegt und mit 0.1 ml des Detektionsreagenz (CSPD ready-to-use) beträufelt. Daraufhin wurde sie mit einer Folie bedeckt und ein Röntgenfilm wurde aufgelegt. Dieser wurde für 20 - 30 min auf der Membran belassen und konnte dann in einem automatischen Röntgenfilm-Entwickler entwickelt werden. Eine Bindungsreaktion von der Sonde an die DNA auf der Membran und dessen Detektion durch den Antikörper und das Detektionsreagenz (Chemilumineszenz-Substrat) zeigte sich als „Aufhellung“ im entsprechenden Bereich des Röntgenfilms.

2.2.21 Sequenzierung von DNA

Durch die Sequenzierung von DNA wird die charakteristische Nukleotidabfolge eines DNA-Moleküls bestimmt. Das in dieser Arbeit angewendete Verfahren beruht auf einer modifizierten Version der Didesoxymethode (Sanger et al. 1977). Diese Methode beinhaltet eine enzymatische Synthese von DNA-Strängen, welche dem zu sequenzierenden Strang komplementär sind. Ein Sequenzierungsansatz enthält neben dem Sequenzierungsprimer und den vier dNTPs auch 2'-3'-Dideoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs). Diesen fehlt die Hydroxylgruppe am 3'-Kohlenstoffatom, weshalb es nach Einbau eines ddNTPs an den neu synthetisierten Strang zu einem Kettenabbruch kommt. Aufgrund der fehlenden OH-Gruppe kann keine neue Phosphodiesterbindung zu einem neu hinzukommenden Nukleotid ausgebildet werden. Auf diese Weise entstehen Fragmente mit unterschiedlicher Länge, die an ihrem 3'-Ende eines der vier ddNTPs tragen. Die ddNTPs sind mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert und können so detektiert werden.

Für die Sequenzierung wurde das „ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ eingesetzt. Aufgrund der unterschiedlich markierten ddNTPs kann der Ansatz der Sequenzierungsreaktion in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Die Analyse erfolgte dann durch Kapillarelektrophorese. Das Pipettierschema für einen Sequenzierungsansatz ist Tab. 14 zu entnehmen.

Tab. 14: Pipettierschema für einen Sequenzierungsansatz

Reagenz	Volumen
DNA (1-300 ng)	x µl
5 x Puffer	1,5 µl
Primer (sense, bzw. antisense 10 µM)	0,5 µl
BigDye	1 µl
ddH ₂ O	ad 10 µl

Die Menge der eingesetzten DNA war abhängig von der Größe der Matrize. Von den PCR-Produkten mit einer Länge von ca. 1000 bp wurden pro Sequenzierungsansatz 30-40 ng DNA eingesetzt. Zur Sequenzierung von Plasmiden wurden 150-300 ng DNA eingesetzt. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte in einem Thermocycler (s. Tab.15).

Tab. 15: Programm für die Sequenzierungs-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Dauer (sec)	Zyklen
Initiale Denaturierung	96	600	1
Denaturierung	96	10	
Hybridisierung	55	5	25
Elongation	60	60	
Kühlen	4	∞	

Die Sequenzierung erfolgte in einem ABI PRISM™ 3100 Genetic Analyzer. Dieses Gerät bestimmt durch eine Vielfarbfluoreszenzmarkierung und Kapillarelektrophorese mit einem Trennmedium (Polymer) automatisch Größe, Sequenz und Menge einer Nukleinsäure. Das Ergebnis wurde als Computerdatei gespeichert.

2.2.22 Auswertung der Sequenzierung

Die vom Sequenzierungslabor bereitgestellte Sequenz konnte mithilfe verschiedener Computerprogramme ausgewertet werden. Mit dem Programm SeqMan II wurde der verwertbare Bereich der Sequenz bestimmt. Die Sequenzen wurden überprüft und dann in einem Assembly, bei dem überlappende Sequenzbereiche identifiziert werden können, zu einer Sequenz, der sogenannten Konsensussequenz, zusammengefügt. Die erhaltenen Konsensussequenzen wurden mit der Software Mac-Vector 8.0 weiter analysiert. Nach Abschluss einer erfolgreichen TOPO-Klonierung, bei der die korrekte Insertion des eingefügten Leserahmens durch die Sequenzierung bestätigt wurde, wurde eine Vektor-Karte des Plasmids angefertigt (s. Anhang 7).

2.2.23 BCA-Assay zur Proteinbestimmung

Um die Proteinmenge zu bestimmen, wurde das Verfahren nach Smith angewendet. Der Nachweis beruht auf der Komplexbildung von Proteinen und Cu²⁺-Ionen in alkalischen

Lösungen (Biuret-Reaktion). Die Cu^{2+} -Ionen dieses Komplexes werden zu einwertigen Kupferionen reduziert, die mit Bicinchinon-Säure (BCA) einen violetten Farbkomplex bilden. In der vorliegenden Arbeit wurde das „Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination“ zur Bestimmung der Proteinmenge in den Proben verwendet.

Zunächst wurde eine Standardreihe mit BSA in PBS hergestellt und in verschiedenen Verdünnungen wurden 10 μl in einer Doppelreihe in eine 96-Loch-Platte pipettiert. Die Proben wurden ebenfalls verdünnt (1:10 und 1:3) und 10 μl wurden in einer Doppelreihe auf die Platte aufgetragen. Auf jeder Platte wurde ein Leerwert mitgeführt. Dazu wurden 10 μl PBS in 2 Kavitäten gegeben, um später von den erhaltenen Werten die Hintergrund-Fluoreszenz abziehen zu können. Dann wurden 4,9 ml der Lösung A mit 100 μl der Lösung B vermischt. Von diesem Gemisch wurden dann 100 μl zu Probe, Standard und Leerwert in die jeweiligen Kavitäten gegeben. Es folgte eine Inkubationszeit von 45 min bei 37 °C. Danach konnte die Absorption bei 570 nm gemessen werden. Die erhaltenen Daten wurden zur weiteren Auswertung und Berechnung der Proteinkonzentration in eine EXCEL-Tabelle eingegeben.

2.2.24 SDS-Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS = engl. Abkürzung für Natriumdodecylsulfat) ist ein Verfahren, das die Trennung von Proteinen und anderen Makromolekülen im elektrischen Feld aufgrund deren unterschiedlicher elektrischer Ladung ermöglicht. SDS ist ein anionisches Detergenz, welches die Eigenladungen von Proteinen effektiv überdeckt, da sich Mizellen mit konstanter negativer Ladung bilden. Die SDS-Protein-Mizellen wandern deshalb während der Elektrophorese zur Anode. Um das Aggregieren der Proteine beim Eintritt in das Gel zu verhindern und schärfere Banden zu erhalten, wurde eine diskontinuierliche Elektrophorese durchgeführt. Hierbei wird das Gel in zwei Bereiche unterteilt: das weitporige Sammelgel und das engporige Trenngel. Es wird eine elektrische Spannung angelegt und alle Ionen wandern mit der gleichen Geschwindigkeit. Die Proteine bilden während ihrer Wanderung im Sammelgel einen Stapel in der Reihenfolge ihrer Mobilitäten aus. Durch diesen Stapeleffekt wandern die Proteine langsam in das Gel ein. So findet eine Vortrennung und Aufkonzentrierung statt. Im Trenngel kommt es dann durch veränderte Pufferbedingungen zu einer Auflösung des Proteinstapels und die einzelnen Komponenten beginnen sich aufzutrennen. Die Molekülgröße hat im engporigen Trenngel einen erheblichen Einfluss auf die Mobilität. Infolge der molekularen Siebeigenschaften des Gels sind die Beweglichkeiten dem \log_{10} der relativen Molekularmassen (M_r) umgekehrt proportional. Anhand der mitgeführten Eichproteine kann

die M_r der unbekanntenen Proteine bestimmt werden. Im eingesetzten Protein-Längenstandard sind Proteine von 10-250 kDa enthalten.

Als Trägermedium wird das Polymer Polyacrylamid verwendet. Es ist chemisch inert und wird durch Polymerisation von Acrylamid und dem Quervernetzungsreagenz N,N'-Methylenbisacrylamid hergestellt. Die Polymerisierungsreaktion wird durch das in Radikale zerfallende Ammoniumpersulfat (APS) gestartet und durch Tetramethylethylendiamin (TEMED) katalysiert. Tab. 16 enthält das Pipettierschema für das Sammel- und Trenngel.

Tab. 16: Pipettierschema für ein 7 % Trenn- und 4 % Sammelgel

Trenngel (7 %)		Sammelgel (4 %)	
2,5 ml	Trenngelpuffer	1,25 ml	Sammelgelpuffer
2,3 ml	Acrylamid (30 %)	0,65 ml	Acrylamid (30 %)
5,1 ml	H ₂ O	3,05 ml	H ₂ O
0,1 ml	SDS (10 %)	0,05 ml	SDS (10 %)
0,04 ml	APS	0,04 ml	APS
0,01 ml	TEMED	0,01 ml	TEMED

Zur Herstellung des Gelsystems wurde zunächst das Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit Butanol überschichtet, um die Ausbildung einer glatten Oberfläche und die vollständige Polymerisierung zu gewährleisten. Anschließend wurde der Alkohol vollständig entfernt und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. Bei der Probenvorbereitung wurden REF-Zellen in Sechs-Loch-Platten ausgesät und am folgenden Tag mit LPS stimuliert. Das Medium wurde 24 h später vorsichtig abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Es wurde eine Zell-Lyse mit Lysis-Puffer und dreimaliges Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff durchgeführt. Die Ansätze wurden jeweils in ein Eppendorfgefäß überführt und für ca. 2 Minuten auf ca. 95 °C erhitzt. Dies diente dazu, die Tertiär- und Sekundärstrukturen der Proteine durch Aufspalten der Wasserstoffbrückenbindungen aufzulösen, und somit eine Streckung der Moleküle zu erreichen. Die Zugabe einer reduzierten Thiolverbindung (z.B. β -Mercaptoethanol) bedingt die Aufspaltung der Schwefelbrücken zwischen den Cysteinen. Die mit SDS beladenen und entfaltenen Aminosäureketten bilden Ellipsoide. Zur Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden 10 μ l der vorbereiteten Proben und 5 μ l des Protein-Längen-Standards in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer Gelkammer über ein denaturierendes Gelsystem durch Anlegen eines konstanten Stroms von 15 mA pro Gel.

2.2.25 Western Blot

Der Western Blot bezeichnet den Kapillartransfer bzw. Elektrotransfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen aus einem Gel auf eine geeignete Membran. Durch die Immobilisierung auf der Membran sind verschiedene Färbe-, Nachweis- und Analysemethoden möglich, die im Gel nicht durchführbar sind, weil die Proteine diffundieren würden. Es wurde eine Nitrozellulose-Membran verwendet, die vor dem Blot für 5 min in Transferpuffer inkubiert wurde, um eine Feuchtigkeitsaufnahme zu gewährleisten. Die Filterpapiere und das Gel wurden ebenfalls für 5 min im Transferpuffer inkubiert. Es wurde ein Semi-Dry-Blot durchgeführt. Dieser besteht aus zwei Plattenelektroden, zwischen denen der Blot aus Filterpapier, Gel und Membran horizontal eingebaut wird. Die in Transferpuffer getränkten Blotbestandteile werden derart auf der Anode angeordnet, dass die Proteine beim Anlegen einer Spannung vom Gel auf die Membran in Richtung Anode wandern können und dort haften bleiben. Der Semidry-Blot wurde bei konstantem Strom durchgeführt (2 mA pro cm²). Für eine hohe Transfereffizienz müssen bestimmte Parameter wie Ionenstärke, pH-Wert des Transferpuffers und Additiva wie Methanol, die Proteinkonzentration und die Vernetzung des Gels berücksichtigt werden.

Das immobilisierte Protein wurde anschließend mithilfe eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran zunächst für 60 min im Blockpuffer II (PBS, 0,05 % TWEEN, 5 % Magermilchpulver) inkubiert. Der primäre Antikörper (Maus- α -iNOS, mAk) wurde 1:2500 in Blockpuffer verdünnt und auf die Membran gegeben. Nach 60 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur oder einer Inkubation bei 4 °C über Nacht auf dem Horizontalschüttler wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mit dem Waschpuffer gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Der sekundäre Antikörper (Ziege- α -Maus IgG), der mit Peroxidase konjugiert und gegen den primären Antikörper gerichtet ist, wurde in einer 1:1000 Verdünnung in Blockpuffer auf die Membran gegeben und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde fünfmal für 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Für die Detektion wurde die Detektionslösung, bestehend aus Western-Blotting-Detektions-Reagens 1 und 2 (ECL), im Verhältnis 1:1 angesetzt und auf die Membran gegeben. Die Detektion der Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper erfolgte über die Redoxreaktion zwischen der Peroxidase und dem ECL-Substrat in der Detektionslösung. In einer Dunkelkammer wurde der Fotofilm auf die richtige Größe zurechtgeschnitten und für 30 bis 120 Sekunden auf die Membran gelegt. An den Stellen, wo der Peroxidase-konjugierte Antikörper gebunden hatte, wurde der Film durch die

entstehende Chemilumineszenz geschwärzt und in einem automatischen Röntgenfilmentwickler entwickelt.

2.2.26 Kopplung von Antikörpern mit Biotin

Der gegen CD200-Rezeptor gerichtete IgG-Antikörper (α -CD200R-bio), sowie der gegen den vCD200-Ligand gerichtete Antikörper OX-2 (α -OX2-bio), wurde uns dankenswerterweise aus dem Labor von N. Barclay (Oxford) zur Verfügung gestellt. Nach Bestimmung der Proteinmenge wurden beide Antikörper auf eine Konzentration auf 1 mg/ml eingestellt. Für die Kopplung wurde Biotin-aminohexansäure-N-hydroxy-succinimidester (Biotin-NHS) verwendet. Der Kopplung von Biotin liegt eine Reaktion der N-hydroxy-succinimidester mit primären Aminen des Antikörpers zugrunde. Es handelt sich dabei um einen nukleophilen Angriff eines deprotonierten Amins auf eine Esterbindung, mit Verdrängung des N-hydroxysuccinimids und Bildung einer Amidbindung.

500 μ l des Antikörpers (1 mg/ml) wurden mit 50 μ l in Wasser gelöstem Hydrogencarbonat und 5 μ l Biotin-NHS vermischt und für 1 h bei RT schüttelnd inkubiert. In der Zwischenzeit wurde eine Sephadex G-25 Gelfiltrationssäule mit 3 x 10 ml PBS äquilibriert. Die Kopplungsreaktion des Antikörpers wurde durch Zugabe von 10 μ l Natriumazid gestoppt. Der Antikörper wurde zusammen mit 1.5 ml PBS auf die Säule gegeben. Nachdem er die Säule durchlaufen hatte, wurden jeweils 250 μ l PBS auf die Säule gegeben und die Fraktionen in 12 vorher entsprechend beschrifteten Eppendorfröhrchen aufgefangen. Die einzelnen Fraktionen wurden danach auf ihren Proteingehalt überprüft. Dazu wurde der Bio-Rad Bradford Proteinassay verwendet. Nach 1:5 Verdünnung mit Wasser wurden 15 μ l dieser Färbelösung mit 15 μ l des Eluats auf einen Parafilm getropft und vermengt. Ein blauer Farbumschlag nach dem Vermischen ist das Maß für den Proteingehalt des Eluats. Alle 250 μ l-Fraktionen, die einen bläulichen Farbumschlag zeigten, wurden zusammen in ein Eppendorf-Röhrchen gefüllt. Zur Stabilisierung des Antikörpers wurde zehnpromzentiges Natriumazid im Verhältnis 1:200 zugegeben. Der gekoppelte Antikörper wurde anschließend im Durchflusszytometer titriert, um die optimale Antikörper-Konzentration für die Färbung zu bestimmen. Um ein Ausbleichen der Fluochrome und deren Konjugate zu vermeiden, wurden diese im Kühlschrank vor Lichteinstrahlung geschützt gelagert.

2.2.27 Cytospins

Diese Methode stellt eine Zell-Fixationsmöglichkeit dar, um im Anschluss eine Färbung dieser Zellen durchführen zu können. Hierzu wurden die Zellen (Makrophagenzelllinie NR

8383, ATCC (CLR 2192), USA) aus dem Zellkulturgefäß entnommen und einmal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen gezählt und auf ein Endvolumen von 4×10^5 Zellen/ml gebracht. 500 µl dieser Zellsuspension wurden in einen Zelltrichter eingegeben, der einem Objektträger auflag. Es folgte eine Zyto-Zentrifugation bei 300 rpm für 7 min. Die Zellen wurden dann unter dem Mikroskop betrachtet, um einen gleichmäßigen Monolayer auf dem Objektträger für die Färbung zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellen auf dem Objektträger fixiert. Dazu wurde dieser für 15 min in 1:1 Aceton/Ethanol bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gestellt. Die Objektträger wurden danach gründlich mit PBS gewaschen und über Nacht getrocknet. Anschließend wurden die Zellen auf dem Objektträger blockiert, um eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu vermeiden. Dazu wurde Serum aus Mausblut 1:1 mit PBS vermischt und für 30 min auf den Zellen belassen. Dann wurden die Zellen mit dem Antikörper iNOS/NOS Type II (mAk) in einer Verdünnung von 1:50 für 30 min in einer feuchten Kammer bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger dreimal mit PBS gewaschen, und für 20 min unter den gleichen Bedingungen mit dem Sekundärantikörper Ziege- α -Maus (HRP [Meerrettichperoxidase] konjugiert) in einer Verdünnung von 1:25 inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschschrift mit PBS und die Detektion der Bindung durch den Farbstoff 3-amino-9-Ethylcarbazol (AEC). Gebundene HRP wird hierbei durch die Umsetzung von AEC in ein rotbraunes, unlösliches Farbprodukt sichtbar gemacht. Zur Herstellung einer Stammlösung wurde eine AEC-Tablette in 2.5 ml N-N-Dimethylformamid gelöst. Für die Arbeitslösung wurden 250 µl der Stammlösung mit 4.75 ml 50 mM Natriumazetatpuffer (pH 5) und 2.5 µl 30 % H_2O_2 vermischt und für 15 min auf den Zellen belassen ($37\text{ }^\circ\text{C}$, 5 % CO_2). Danach wurden die Objektträger wiederholt mit PBS gewaschen. Der Farbumschlag wurde im Mikroskop betrachtet und fotografiert.

2.2.28 Durchflusszytometrische Analysen

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die qualitative und quantitative Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen und Partikeln in einem Flüssigkeitsstrom. Mithilfe dieser Methode können zum einen Oberflächenproteine von Zellen über Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper, intrazelluläre Proteine oder Nukleinsäuren, die eine eigene Fluoreszenz (z.B. GFP) aufweisen, detektiert werden. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Durch die Streuung des Lichts an der Zelle können Informationen über die Größe (Vorwärtsstreulicht) und Granularität (Seitwärtsstreulicht) der Zelle gewonnen werden. Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse ermöglicht die Unterscheidung und Auftrennung von Zellen nach vorhandener Fluoreszenz durch Laser-Aktivierung

und -Abtastung. Die verschiedenen Parameter wie Zellgröße, Populationszugehörigkeit, Verteilungswerte und Fluoreszenzstärke können in Abhängigkeit voneinander in Histogrammen oder Dot-Plots dargestellt werden.

Für die durchflusszytometrischen Messungen wurden die Zelllinien REF und Makrophagen (Makrophagenzelllinie, ATCC (CLR 2192), USA) sowie aus Ratten gewonnene peritoneale Makrophagen verwendet (siehe 2.2.29). Die zu analysierenden Zellen wurden in einer Sechs-Loch-Platte ausgesät, die im Falle der peritonealen Makrophagen aus der Ratte keinerlei Beschichtung aufweisen durfte, um ein Anhaften der peritonealen Makrophagen zu verhindern. Die Zellen wurden aus den Sechs-Loch-Platten abgelöst, durch Zentrifugation (1200 rpm, 5 min, RT) pelletiert und zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Stammten die Zellen aus dem Peritoneum der Tiere, wurden nach der Gewinnung zunächst die Erythrozyten lysiert. Dazu wurden die Zellen mit Erythrozyten-Lyse-Puffer (4 °C) zweimal, und anschließend mit 4 °C kaltem PBS einmal gewaschen. Schließlich wurden alle in der Durchflusszytometrie verwendeten Zellen mithilfe der Neubauer-Kammer gezählt und auf eine Konzentration von 10^6 Zellen pro ml gebracht. Jeweils 200 μ l dieser Zell-Suspension wurden in eine Kavität einer 96-Loch-Platte gegeben. Darin wurde die Fixierung mit 2.5% Formaldehyd, die Färbung und gegebenenfalls die Permeabilisierung der Zellen für eine intrazelluläre durchflusszytometrische Messung vorgenommen. Die Permeabilisierung wurde mit 0.5 % Saponin in PBS durchgeführt. Dieses Detergenz permeabilisiert reversibel die Zellmembran, so dass die Antikörper diese passieren können. Proben mit einem Fluochrom-markierten Antikörper wurden im Dunkeln inkubiert. Wenn die Zellen mit mehr als einem Antikörper gefärbt wurden, wurden die einzelnen Färbungen nacheinander durchgeführt. Zwischen den einzelnen Färbeschritten wurden die Zellen in der 96-Loch-Platte in einer Plattenzentrifuge (Hettich Rotixa 50RS, 1200 rpm, 5 min, 4 °C) zentrifugiert. Die verwendeten Antikörper sind in Tab. 3 dargestellt. Für die Messung wurden die Zellen in 200 μ l FACS-Puffer aufgenommen und in spezielle Röhrchen (*cluster tubes*) überführt. Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgte mithilfe des Durchflusszytometers; zur Auswertung wurde die Gerätinterne Software CellQuest Pro verwendet. Für weitergehende und genauere Analysen der einzelnen Zellpopulationen wurde außerdem die Software FlowJo verwendet. Hier wurde neben der Darstellung zweier Fluoreszenzkanäle gegeneinander in einem zweidimensionalen Streudiagramm auch die softwareeigene Berechnung des geometrischen Mittels der Fluoreszenzintensivität genutzt.

2.2.29 Untersuchung von Tierproben

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Gewebe untersucht, die aus einem Tierversuch (Tierversuchsnummer: G 0055/03) mit 35 Tieren gewonnen wurden. In Tab. 17 ist der Aufbau des Tierversuchs dargestellt. Jede Gruppe bestand aus fünf ca. acht Wochen alten Ratten vom Sprague-Dawley Stamm. Der Tierversuch wurde dankenswerterweise von Herrn PD Voigt durchgeführt.

Tab. 17: Versuchsgruppen-Übersicht

Gruppennummer	Virus	Getötet (<i>post infectionem</i>)
Gruppe 1	mock-infiziert	24 h
Gruppe 2	RCMV-wt	48 h
Gruppe 3	RCMV- Δ CD200	48 h
Gruppe 4	RCMV-revCD200	48 h
Gruppe 5	RCMV-wt	6 d
Gruppe 6	RCMV- Δ CD200	6 d
Gruppe 7	RCMV-revCD200	6 d

Die Tiere der Gruppe 1 stellen die Kontrollgruppe dar und bekamen 1 ml PBS intraperitoneal injiziert. Die Tiere der Gruppen 2 - 7 wurden alle zum gleichen Zeitpunkt mit einer Menge von 1×10^7 Viren in 1 ml PBS intraperitoneal infiziert. Nach der Tötung der Tiere durch das Inhalationsanästhetikum Isofluran erfolgte die Entnahme der peritonealen Exsudatzellen (PEZ) mithilfe einer 20 Gauge Kanüle durch Peritoneallavage mit kaltem PBS. Die PEZ wurden auf Eis zwischengelagert und zentrifugiert. Die Erythrozyten wurden lysiert und nach einem weiteren Waschschrift (2.2.8) gezählt. Im Anschluss wurde eine Antikörper-Färbung (s. 2.2.28) durchgeführt, um einen Teil der PEZ mit der FACS-Methode zu untersuchen. Aus einem anderen Teil der PEZ wurde RNA isoliert (s. 2.2.10), um mit dem Material TaqMan-PCRs durchzuführen. Nach der Peritoneallavage wurden den Tieren die in Tab. 18 angegebenen Organe entnommen, die sowohl in geeigneten Gefäßen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren, als auch mithilfe des Tissue-Tec Verfahrens kryokonserviert wurden, um Gewebedünnschnitte für immunhistochemische Färbungen anfertigen zu können. Bei diesem Verfahren werden Gewebestücke in eine Plastikkavität, deren Boden bereits mit dem Gewebekleber Tissue Tec bedeckt ist, gelegt. Nach Einlegen des Gewebes wird die Kavität mit dem Gewebekleber aufgefüllt, und dann in eine mit Methylbutan befüllte Pyrexschale gestellt, die wiederum zur Kühlung auf Trockeneis stand, um das Gewebe schnellstmöglich zu gefrieren.

Die Dünnschnitte der Gewebe und die immunhistochemischen Färbungen wurden im Labor von N. Barclay (University of Oxford) durchgeführt. Mithilfe von Antikörpern können bei dieser Methode im Gewebe enthaltene Proteine sichtbar gemacht werden. Es wurden folgende Antikörper verwendet: iNOS/NOS Type II mAk/ Ziege- α -Maus (HRP [Meerrettichperoxidase] konjugiert) und Maus- α -Ratte MHC II RT1 B, Alexa Fluor 488 konjugiert (s. Tab. 3). Die Ergebnisse der Färbungen wurden mir zur Verfügung gestellt (s. 3.8).

1 g der Leber und Milz jedes Tieres wurde nach der Entnahme mithilfe eines Siebes homogenisiert, um den Virustiter in den Organen zu bestimmen (s. 2.2.7). Aus einem weiteren Stück der Milz und Leber wurde RNA resp. DNA isoliert (s. 2.2.9, 2.2.10), um das Material zur Durchführung von TaqMan-PCRs zu verwenden. Alle Versuche, die mit dem aus dem Tierversuch gewonnenen Material geplant worden sind, sind in Tab. 18 dargestellt.

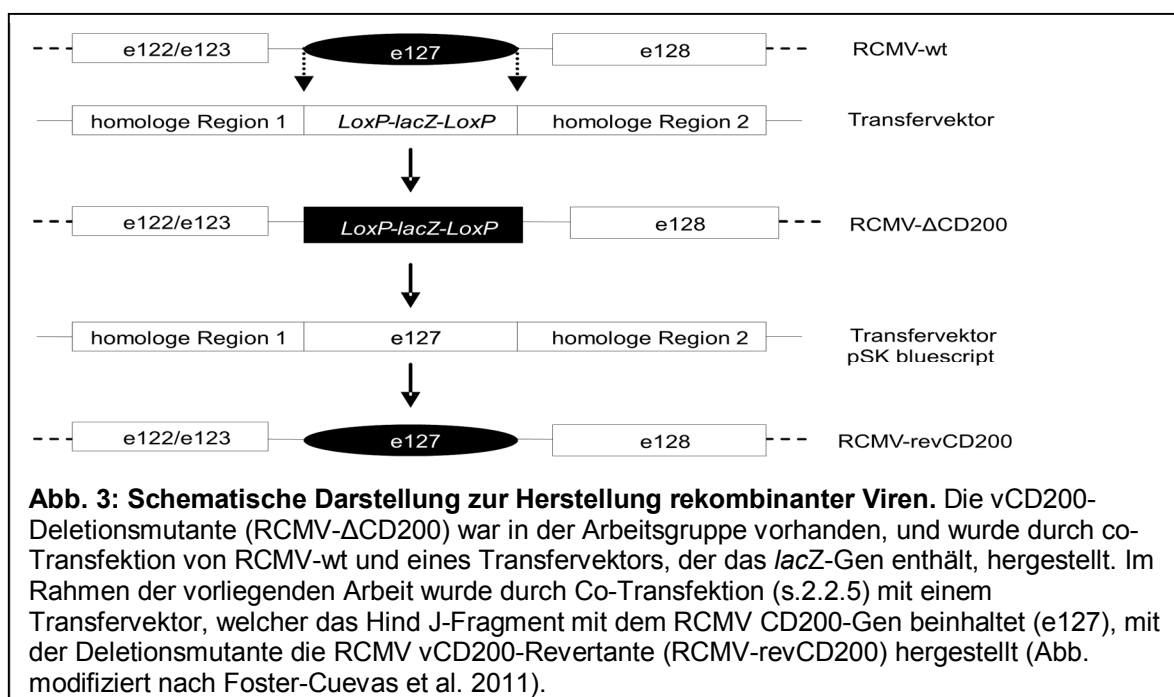
Tab. 18: Durchgeführte Versuche mit dem Probenmaterial aus den Tieren

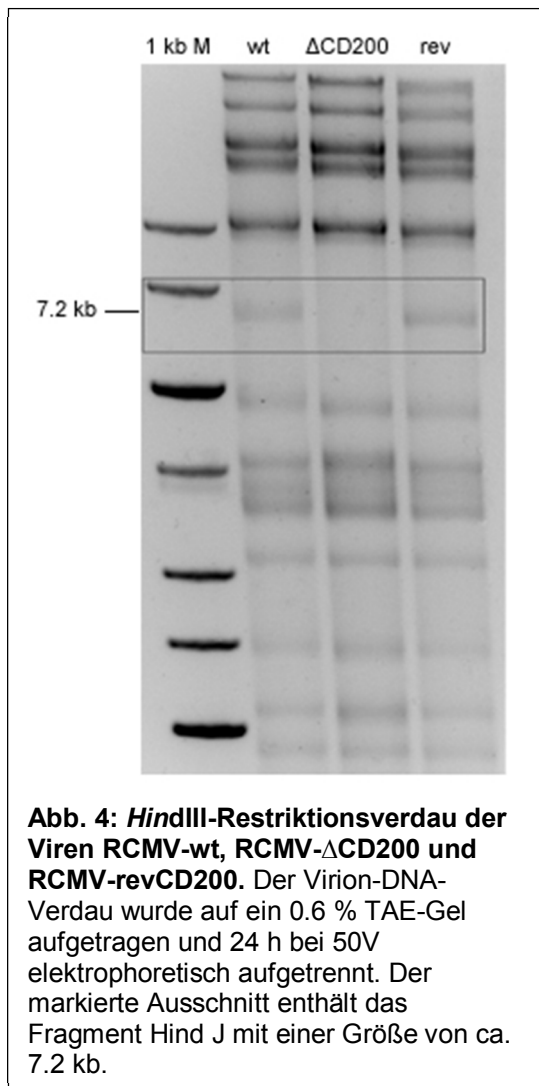
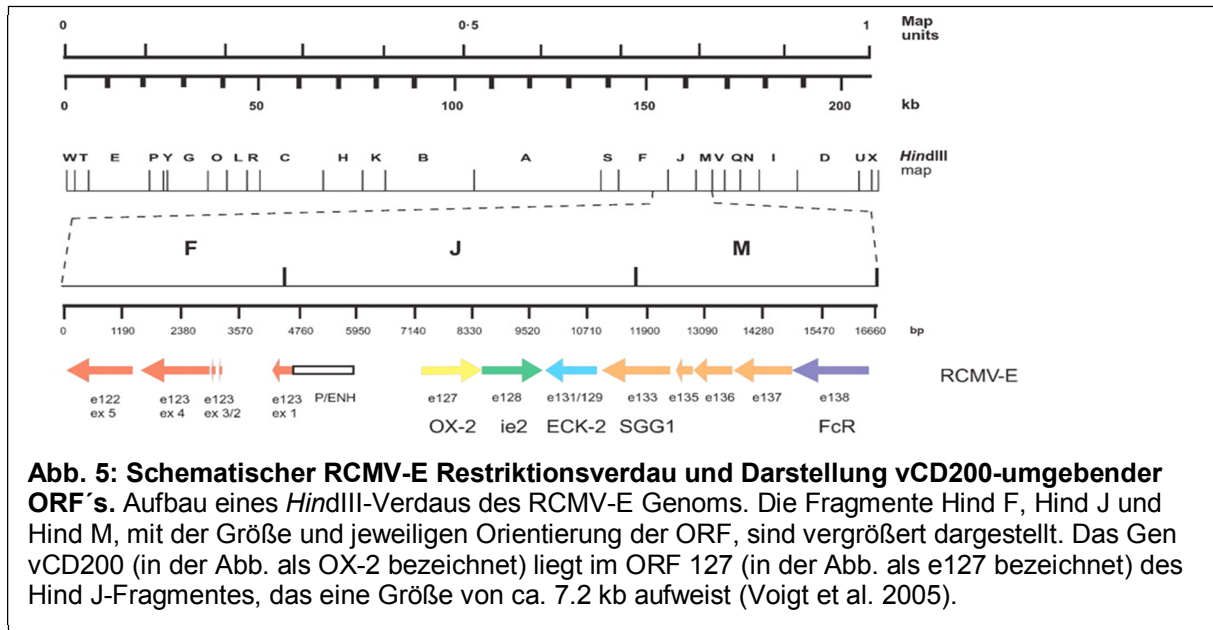
Gewebe	Virus-Titration	Tissue-Tec / Immunhistochemie	FACS	TaqMan-PCR (DNA)	TaqMan-PCR (cDNA)
Lunge		X			
Leber	X	X			
Milz	X	X / X		X	X
Lymphknoten		X			
peritoneale Exsudatzellen (PEZ)			X		X

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung und Charakterisierung einer RCMV CD200-Revertante

Um auszuschließen, dass bei der homologen Rekombination im Rahmen der Herstellung der RCMV CD200-Deletionsmutante (RCMV- Δ CD200) unerwünschte Mutationen innerhalb des RCMV-Genoms auftraten, die für einen veränderten Phänotyp verantwortlich sind, wurde eine Virusrevertante (RCMV-revCD200) ebenfalls durch homologe Rekombination in eukaryoten Zellen hergestellt. Nach Infektion von REF wurde genomische DNA von RCMV- Δ CD200 aus Virionen gewonnen. Diese wurde mit dem Hind J-Fragment, welches in dem Plasmid pSK bluescript kloniert vorlag und das RCMV CD200-Gen mit flankierenden homologen Regionen enthielt, co-transfiziert (s. Abb. 3). Nach der Co-Transfektion von RCMV- Δ CD200 Virion-DNA und dem Plasmid wurden Überstände der REF, die Plaquebildung zeigten, isoliert. Das in die RCMV Δ CD200-Deletionsmutante inserierte *lacZ*-Gen kodiert für das Enzym β -Galactosidase, welches in der Lage ist das Substrat X-Gal umzusetzen. Dies führt zu einer Blaufärbung von RCMV- Δ CD200 infizierten Zellen. Mithilfe der β -Galaktosidase-Färbung und limitierenden Verdünnungen konnte RCMV-revCD200, das keinen *lacZ*-Leserahmen enthält, aus infizierten Zellen isoliert werden.



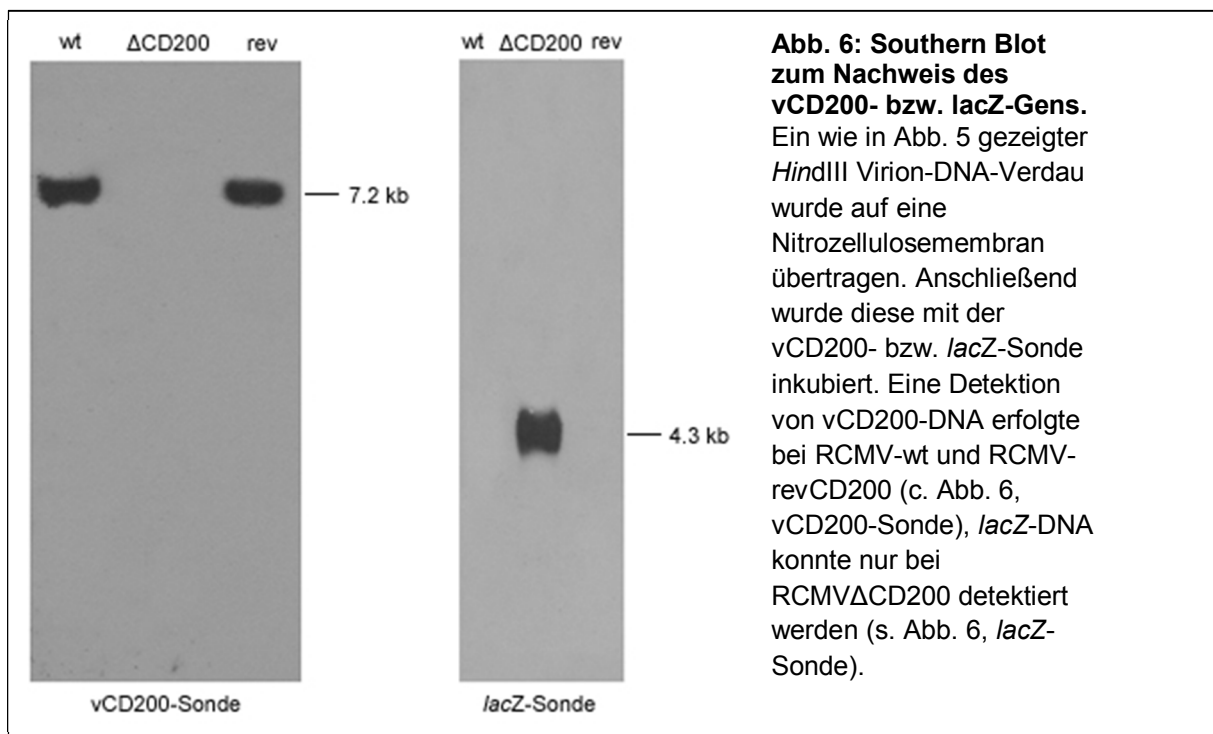


Zur Charakterisierung von RCMV-revCD200 wurde Virion-DNA isoliert. Durch enzymatische Hydrolyse mit dem Enzym *HindIII* (s. 2.2.19) ergibt sich ein spezifisches Bandenmuster des RCMV-Genoms, die Fragmente mit unterschiedlicher Größe sind in Abb. 4 dargestellt. vCD200 ist im offenen Leserahmen (ORF) 127 in dem *Hind* J-Fragment lokalisiert, das eine Größe von 7.2 kb aufweist (s. Abb. 4).

Mithilfe eines *HindIII*-Virion-DNA-Verdau wurden die Restriktionsmuster von RCMV-revCD200, RCMV-wt und RCMV- Δ CD200 verglichen (s. Abb. 5). Anhand des erhaltenen Bandenmusters konnte gezeigt werden, dass ein DNA-Fragment mit einer Größe von 7.2 kb entsprechend dem *Hind* J-Fragment bei RCMV-wt und RCMV-revCD200 vorhanden ist (s. Abb. 5, wt und rev). Bei RCMV- Δ CD200 (s. Abb. 5, Δ CD200) wurde das Gen e127 entfernt und durch den *lacZ*-Leserahmen ersetzt, so dass für dieses Virus im *HindIII* Virion-DNA-Verdau keine

Bande in dieser Größe vorhanden ist. Im restlichen Genom der Viren konnten im DNA-Verdau keine Veränderungen des Restriktionsmusters und der Fragmentgröße bei RCMV-revCD200 im Vergleich zum RCMV-wt beobachtet werden.

Zum sequenz-spezifischen Nachweis des ORF e127 wurde ein Southern Blot durchgeführt. Dazu wurde die DNA auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet und die Membran im Anschluss mit einer *lacZ*- sowie vCD200-Sonde inkubiert. Abb. 6 zeigt die Ausschnitte des jeweiligen Röntgenfilms mit den Membran-gebundenen Sonden. Nur bei RCMV-wt und RCMV-revCD200 kann vCD200 nachgewiesen werden (s. Abb. 6, vCD200-Sonde). Da das vCD200-Gen im Fragment Hind J des RCMV-E lokalisiert ist und ein *Hind*III Virion-DNA-Verdau durchgeführt wurde, ergibt sich auch im Southern Blot eine Größe von 7.2 kb für das vCD200-Gen bei RCMV-wt und RCMV-revCD200. Eine Bindung der *lacZ*-Sonde an die DNA (s. Abb. 6, *lacZ*-Sonde) erfolgt nur bei RCMV- Δ CD200.



Als letzter Schritt der Überprüfung der korrekten Lokalisation des vCD200 wurden das vCD200-Gen, sowie die flankierenden Bereiche der Virusrevertante sequenziert (ca. 1000 bp) und mit der Sequenz des RCMV-wt verglichen. Die verwendeten Primer sind in Tab. 5, Nr. 17 & 18 angegeben. Die Sequenzierung ergab eine 100-prozentige Übereinstimmung zwischen RCMV-revCD200 und RCMV-wt im untersuchten Bereich des Virus-Genoms.

3.1.1 Wachstumsverhalten von RCMV-wt, RCMV- Δ CD200 und RCMV-revCD200

Bei der homologen Rekombination zur Herstellung rekombinanter Viren können Gen-Deletionen in einem Bereich des Genoms stattfinden, die sich auf die Replikation des Virus auswirken. Zum Vergleich des Wachstumsverhaltens der drei Viren (RCMV-wt, RCMV-revCD200, RCMV- Δ CD200) wurden REF-Zellen in Sechs-Loch-Platten ausgelegt und mit hoher (5) und niedriger (0.01) MOI im dreifachen Ansatz infiziert (s. 2.2.8). In Abb. 7 und 8 ist deutlich zu erkennen, dass alle drei verwendeten Viren, sowohl bei hoher als auch bei niedriger MOI, ein nahezu gleiches Wachstum *in vitro* zeigen. Zur Kontrolle der Virus-Titer wurden Rücktitrationen angefertigt, um zu verifizieren, dass die Versuche mit der gleichen Virusmenge durchgeführt wurden (s. Abb. 7 und 8, Zeitpunkt 0). Zum Zeitpunkt 4 h nach Infektion fällt der Virus-Titer ab, da die Zellen eine Stunde nach Infektion gewaschen wurden, und dadurch die Virus-Menge im titrierten Überstand reduziert wurde. Das definierte Stadium zwischen der Freisetzung des viralen Genoms nach Infektion der Zellen und dem Beginn des Zusammenbaus neuer infektiöser Partikel wird als Eklipse bezeichnet. In diesem Zeitraum können keine infektiösen Viruspartikel nachgewiesen werden. Bei der Wachstumskurve mit hoher MOI (s. Abb. 7) ist die Eklipse weniger deutlich, als bei der Wachstumskurve mit niedriger MOI (s. Abb. 8), da eine große Virusmenge zur Infektion eingesetzt wurde und Rest-Virus in den Überständen vorhanden war. Nach 72 h waren alle Zellen, die mit hoher MOI infiziert worden waren, vollständig lysiert. Zum Zeitpunkt 168 h nach Infektion waren auch die Zellen der Wachstumskurve mit niedriger MOI vollständig infiziert. Indem alle drei Viren in diesem Versuch gleich gute Wachstumseigenschaften zeigten wird deutlich, dass das e127-Gen keinen Einfluss auf die Replikation *in vitro* hat und die Viren wurden für die weiteren Versuche eingesetzt.

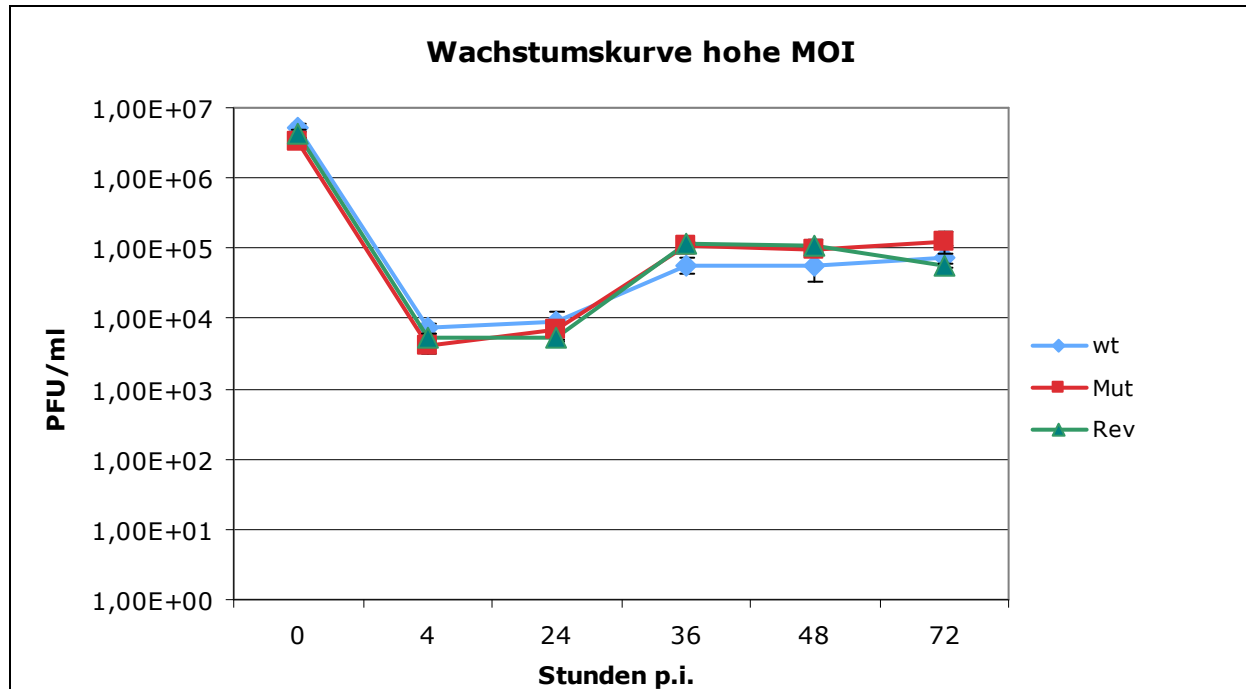


Abb. 7: Wachstumskurve bei hoher MOI (5). Die Wachstumskurven der Viren (RCMV-wt: wt; RCMV- Δ CD200: Mut; RCMV-revCD200: Rev) wurden dreifach auf REF-Zellen durchgeführt. Auf der Abszisse ist die Zeit nach Infektion der Zellen dargestellt (Stunden p.i.), auf der Ordinate sind die jeweiligen Titer (PFU/ml) aufgetragen.

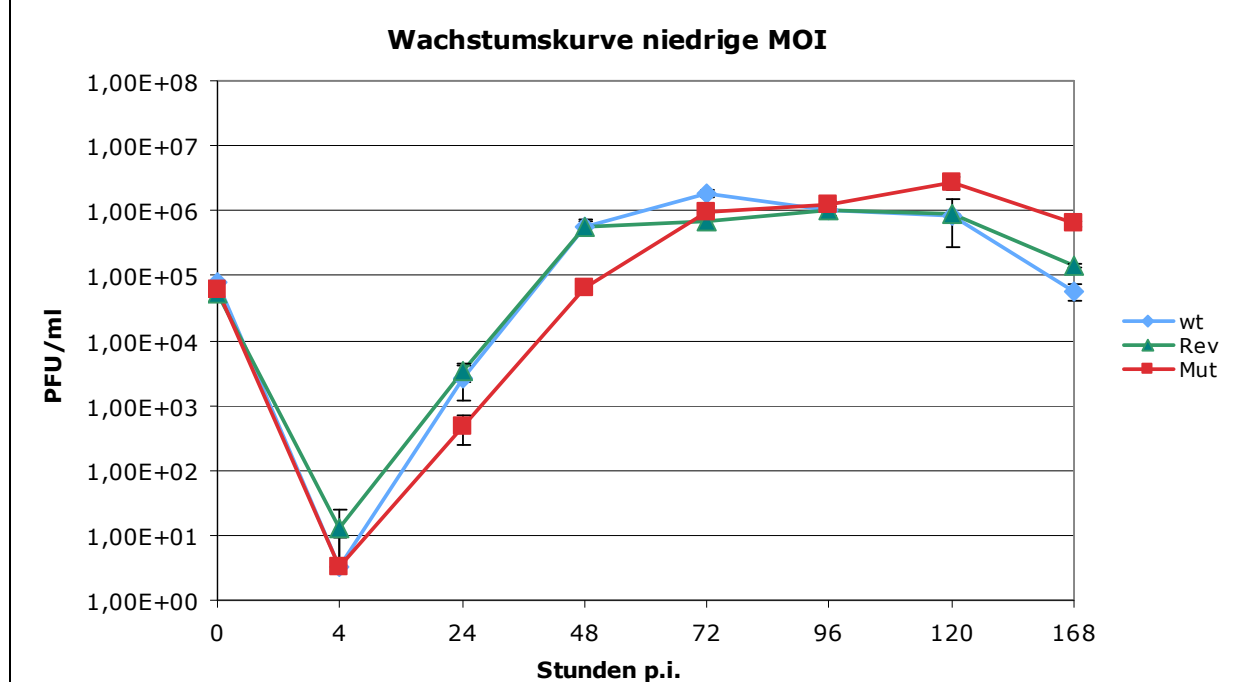


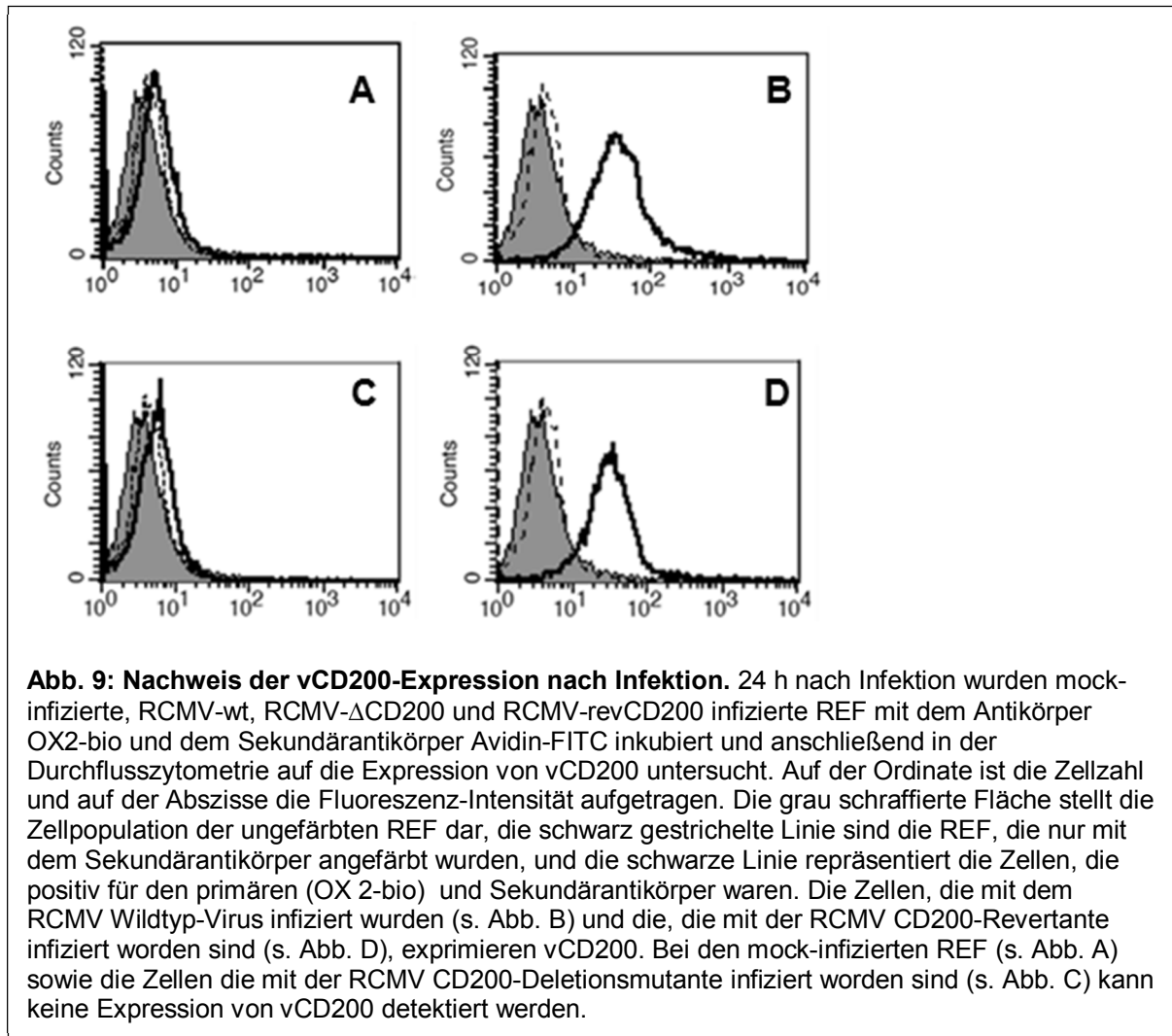
Abb. 8: Wachstumskurve bei niedriger MOI (0.01). Die Wachstumskurven der Viren (RCMV-wt: wt; RCMV- Δ CD200: Mut; RCMV-revCD200: Rev) wurden dreifach auf REF-Zellen durchgeführt. Auf der Abszisse ist die Zeit nach Infektion der Zellen dargestellt (Stunden p.i.), auf der Ordinate sind die jeweiligen Titer (PFU/ml) aufgetragen.

3.2 Protein-Expression von vCD200 und CD200R in vitro

Wie in der Hypothese (s. 1.4) dargestellt, sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von vCD200 auf die Aktivierung von Makrophagen untersucht werden. Dabei wurde angenommen, dass es durch Expression des vCD200-Liganden (nach Infektion mit RCMV-wt und RCMV-revCD200) und Bindung des Liganden an den CD200-Rezeptor (exprimiert auf Makrophagen) zu einer verminderten Aktivierung der Makrophagen kommt. Mithilfe der Durchflusszytometrie sollte zunächst die Expression von vCD200 24h nach Infektion mit RCMV-wt und RCMV-revCD200 auf REF und Makrophagen überprüft werden, und im Anschluss die Expression des Rezeptors CD200R auf der verwendeten Makrophagenzelllinie und PEZ aus der Ratte.

3.2.1 Expression von vCD200 auf REF und Makrophagen nach RCMV-Infektion

Die Zellen wurden 24 h nach Infektion mit den Viren zunächst mit dem gegen das RCMV CD200 gerichteten Antikörper OX2-bio, anschließend dem Sekundärantikörper α -Biotin-Avidin-FITC inkubiert (s. Tab. 3) und schließlich mithilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Der OX2-bio Antikörper erkannte das virale CD200-Homolog auf RCMV-wt (s. Abb. 10 B) und RCMV-revCD200 (s. Abb. 9 D) infizierten Zellen, während bei der mock-infizierten (s. Abb. 9 A) und RCMV- Δ CD200-infizierten Zellen (s. Abb. 9 C) kein Signal detektiert werden konnte. Auf der verwendeten Makrophagenzelllinie konnte mithilfe der Durchflusszytometrie keine Expression von vCD200 nach Infektion nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

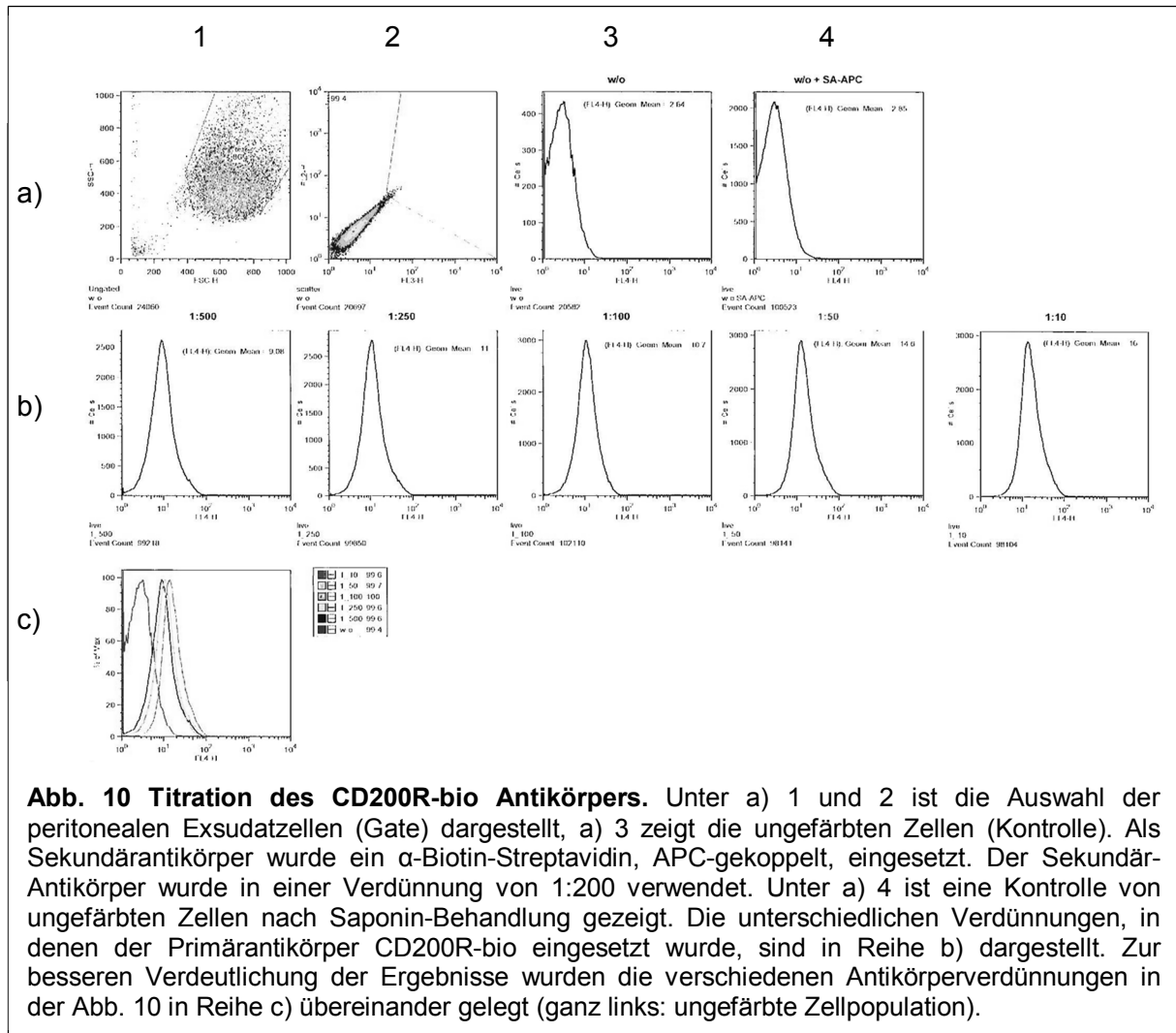


3.2.2 Nachweis der Expression von CD200R auf Makrophagen

Die CD200-Rezeptor-Expression wurde für die verwendeten Makrophagenzelllinie und PEZ mithilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Dazu wurden mock-infizierte und mit den verschiedenen Viren infizierte Makrophagen 24h nach Infektion untersucht. Der Antikörper musste zunächst biotinyliert und titriert werden.

3.2.2.1 Titration des CD200-Rezeptor-Antikörpers für die Durchflusszytometrie

Der CD200R-Antikörper wurde zunächst biotinyliert (s. 2.2.26). Als sekundärer, Fluorophor-tragender Antikörper wurde α -Biotin-Streptavidin-APC eingesetzt. Mithilfe des CD200R-Antikörpers wurde die Expression des Rezeptors auf der Makrophagenzelllinie und später auf den extrahierten PEZ untersucht. Die Titration erfolgte sowohl für die Makrophagenzelllinie und die PEZ und wies das gleiche Ergebnis auf.



Jede im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Titration eines Antikörpers für die Durchflusszytometrie erfolgte nach dem in Abb. 10 dargestellten Schema, gezeigt ist die Titration des CD200R-Antikörpers auf PEZ. Für die weiteren Versuche wurde der Antikörper 1:50 verdünnt, da in dieser Verdünnung nur noch geringe Überlappungen mit der ungefärbten Zellpopulation stattfinden. Nach Titration des Antikörpers wurde der Anteil der CD200R positiven Zellen bestimmt. Dieser lag bei den PEZ bei ca. 95 %. Vergleichbare Ergebnisse konnten für die Makrophagenzelllinie gewonnen werden (Daten nicht gezeigt). Somit wurde für beide Zellpopulationen eine Expression von CD200R nachgewiesen.

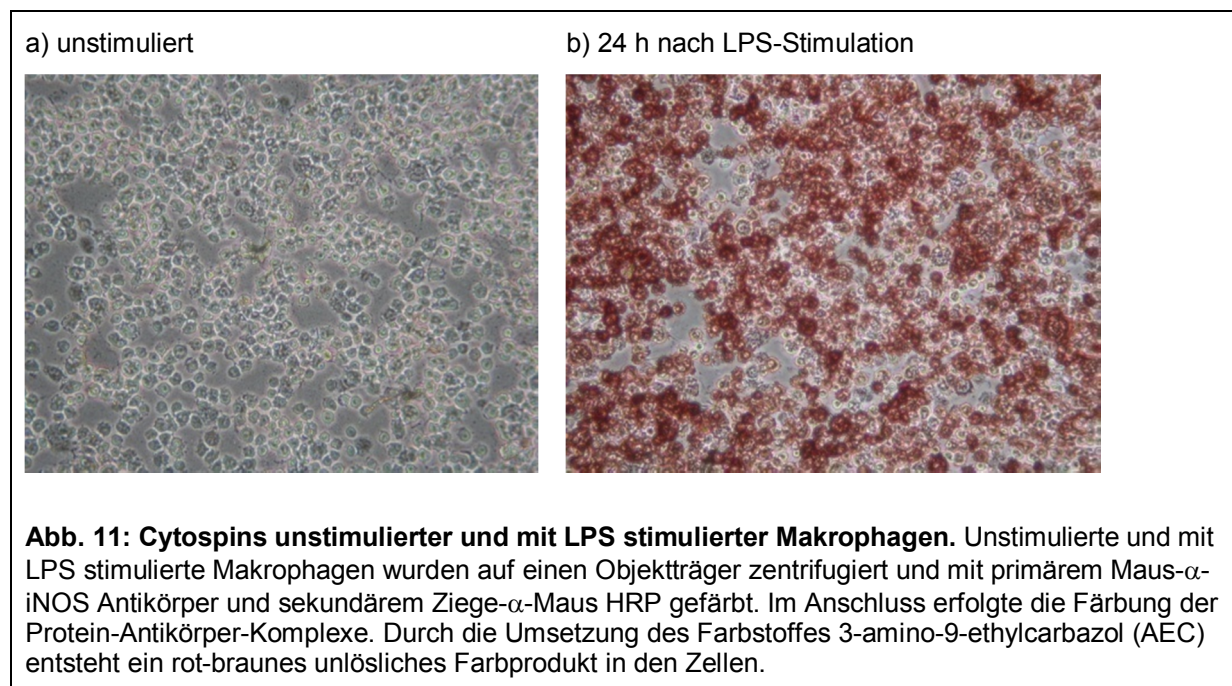
3.3 Nachweis der iNOS-Expression in Makrophagen *in vitro*

Als Marker für den Aktivierungszustand der untersuchten Makrophagen wurde in der vorliegenden Arbeit das Enzym iNOS verwendet. Um iNOS als Messgröße für die Aktivierung von Makrophagen sinnvoll einsetzen zu können, wurde zunächst versucht, iNOS

in der Makrophagenzelllinie (NR 8383) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Stimulierung der Zellen mit Lipopolysaccharid (LPS) nachzuweisen. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob LPS als alleiniger Stimulator für eine Induktion der iNOS-Produktion der verwendeten Makrophagen ausreicht oder ob ein weiterer co-Stimulator (z.B. Interferon- γ) benötigt wird.

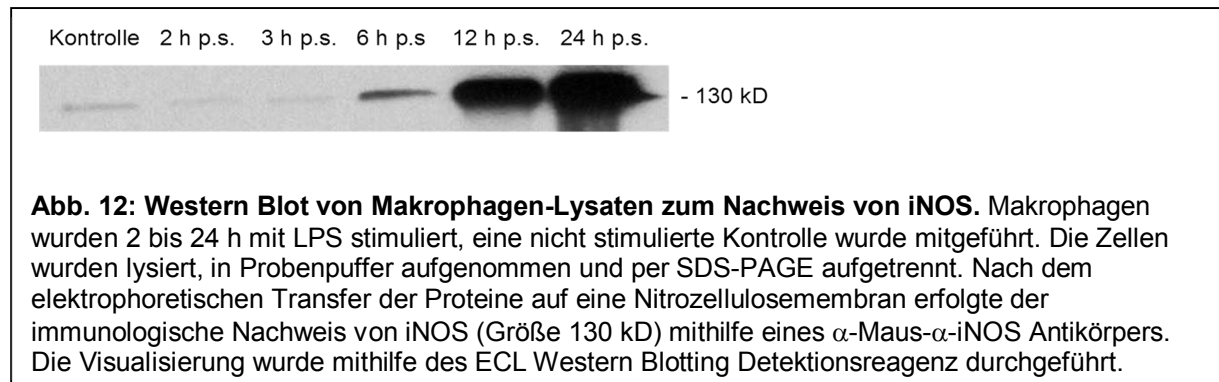
3.3.1.1 Stimulierung der iNOS-Expression mit LPS in der Makrophagenzelllinie

Die Makrophagen wurden in Sechs-Loch-Platten ausgelegt und 24 h mit LPS stimuliert. In Abb. 11 b ist zu erkennen, dass 24 h nach der Stimulierung mit LPS ca. 90 % der Zellen iNOS produzierten. Als Negativ-Kontrolle wurden Zellen untersucht, die nicht mit LPS stimuliert worden waren. Diese Zellen weisen nur eine sehr geringe Produktion des Enzyms auf (Abb. 11 a).



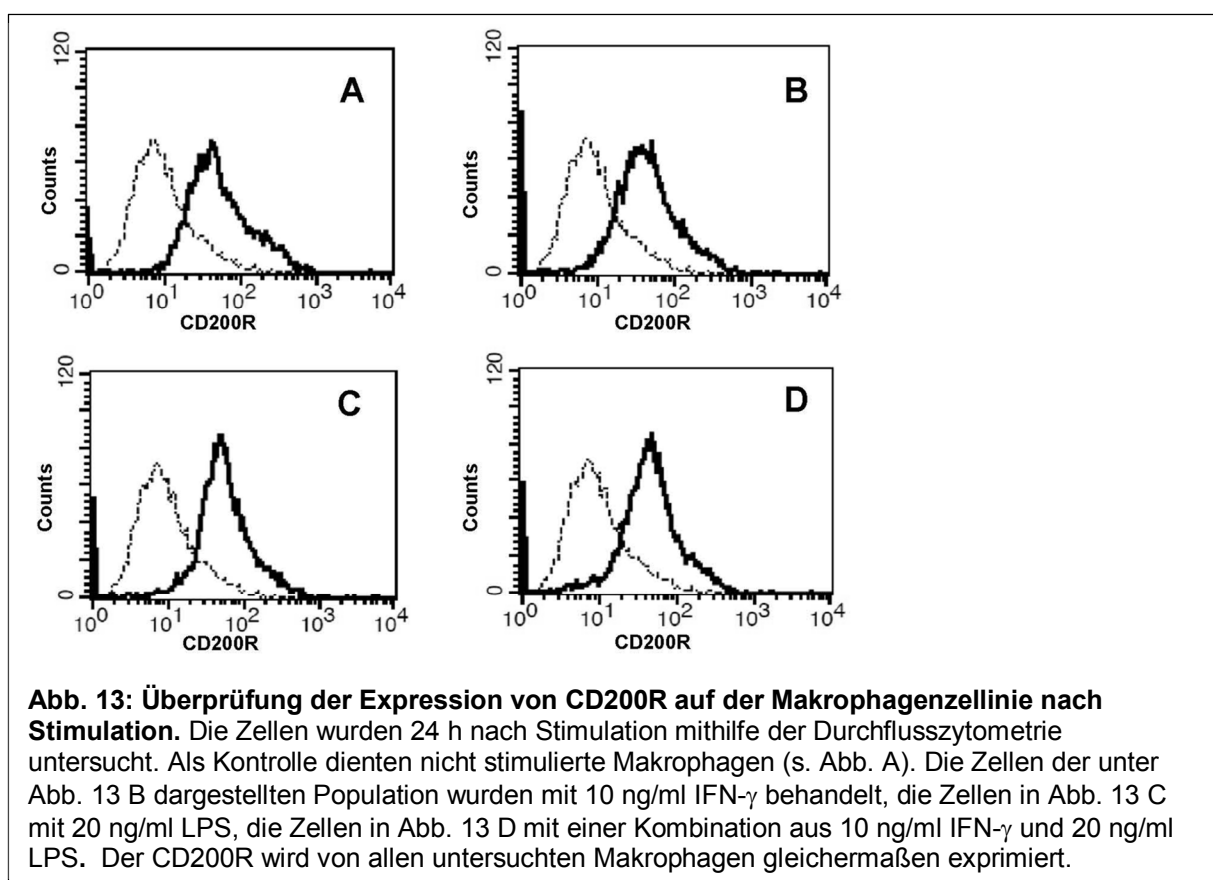
Zur Bestätigung der oben gezeigten Ergebnisse und der Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Stimulierung wurde im Anschluss ein Western Blot durchgeführt. Die LPS-abhängige Induktion der iNOS-Expression der Makrophagenzelllinie konnte im Western Blot bestätigt werden. Um gleiche Proteinmengen aufzutragen, wurde der Proteingehalt der Lysate mit dem BCA-Assay bestimmt (s. 2.2.23). Die Zellen wurden in Sechs-Loch-Platten ausgelegt. Zu den Zeitpunkten 2, 3, 6, 12 und 24 h nach Stimulation (p.s.) wurden Lysate hergestellt und die Proteine per SDS-PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese) separiert (s. 2.2.24).

Anschließend erfolgte der elektrophoretische Transfer auf eine Nitrozellulosemembran. Im Western Blot konnte gezeigt werden, dass es 6 h nach der Stimulation der Zellen mit LPS zu einer im Gegensatz zur Basalexpression erhöhten iNOS-Expression kommt, die bei einer Stimulierung von 12 und 24 h ansteigt (s. Abb. 12). Eine zusätzliche Stimulation der Makrophagen mit Interferon- γ (IFN- γ) wurde im Rahmen von durchflusszytometrischen Messungen zum Nachweis des CD200R durchgeführt (s. Abb. 13).



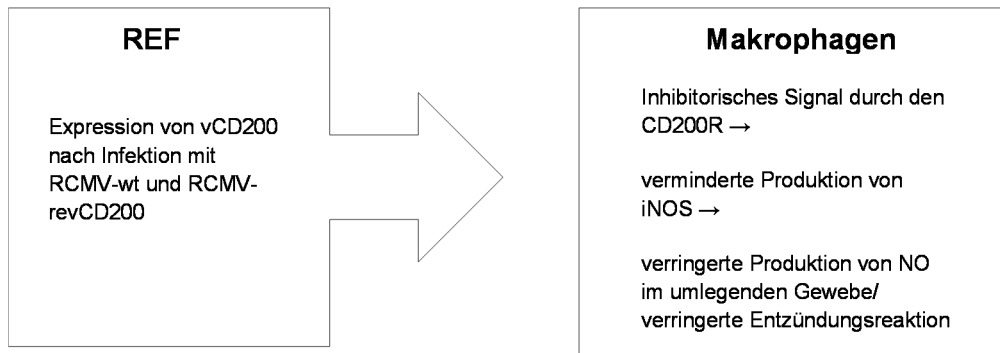
3.3.1.2 Einfluss der Makrophagen-Stimulation auf die Expression von CD200R

Die Überprüfung ob die Expression des CD200R auf den Makrophagen der Zelllinie NR 8383 sich bei einer Stimulation der Zellen mit LPS verändert, wurde mithilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Die Zellen wurden jeweils 24h mit 10 ng/ml IFN- γ (s. Abb. 13 B), mit 20 ng/ml LPS (s. Abb. 13 C) und 10 ng/ml IFN- γ zusammen mit 20 ng/ml LPS (s. Abb. 13 D) stimuliert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation der Zellen keinen Einfluss auf die Expression des Rezeptors im Vergleich zu unstimulierten Makrophagen hat (s. Abb. 13 A).



3.3.1.3 Vergleich der iNOS-Expression bei REF/Makrophagen co-Kultur

Um zu überprüfen, ob eine Infektion mit RCMV-wt und RCMV-revCD200 durch die Expression von vCD200 Einfluss auf die iNOS-Expression in Makrophagen hat, wurden REF/Makrophagen co-Kulturen mit RCMV-wt, RCMV- Δ CD200 und RCMV-revCD200 infiziert. Das folgende Schema beschreibt die Annahme:



REF wurden mit RCMV-wt, RCMV- Δ CD200 und RCMV-revCD200 infiziert, bzw. nicht infiziert (mock). 24 h nach Infektion wurden Makrophagen der Zelllinie NR 8383 im Verhältnis 1:1 zu den REF gegeben, und weitere 24 h später wurden Lysate gewonnen und per SDS-PAGE aufgetrennt. Die Zellen wurden vor dem Versuch ausgezählt und in gleichen Mengen eingesetzt. Das Lysat der mit RCMV- Δ CD200 infizierten REF/Makrophagen-Co-Kultur zeigt eine dezente iNOS-Bande (s. Abb. 14),

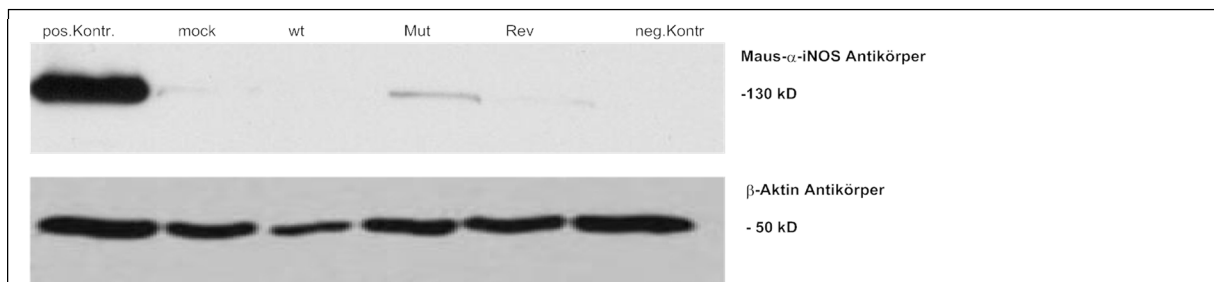


Abb. 14: Western Blot von Lysaten einer Makrophagen/REF co-Kultur nach Infektion. REF wurden mit RCMV-wt (wt), RCMV- Δ CD200 (Mut) und RCMV-revCD200 (Rev) infiziert, bzw. nicht infiziert (mock). 24 h nach Infektion wurden Makrophagen im Verhältnis 1:1 zu den REF gegeben, und weitere 24 h später wurden Lysate gewonnen und per SDS-PAGE aufgetrennt. Im Anschluss erfolgte der elektrophoretische Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran. Der immunologische Nachweis von iNOS erfolgte mithilfe des Maus- α -iNOS Antikörpers. Die Visualisierung erfolgte mit ECL Western Blotting Detektionsreagenz (s. 2.1.9). Gezeigt sind die Ausschnitte des Röntgenfilms des iNOS-Blots und der Protein-Ladekontrolle β -Aktin. Als Positivkontrolle wurden Makrophagen, die 24 h mit LPS stimuliert worden waren, verwendet. Die Negativkontrolle ist ein Lysat aus REF, die kein iNOS produzieren.

Diese Bande ist deutlicher als die Banden aus Lysaten von mock-infizierten, mit RCMV-wt und RCMV-revCD200 infizierten Zellen (s. Abb.14). Das Ergebnis deutet darauf hin, dass bei der co-Kultur, die mit RCMV- Δ CD200 infiziert wurde, durch die fehlende Expression von vCD200 eine vermehrte Aktivierung der Makrophagen erfolgt ist. Die Negativ-Kontrolle stellen REF dar, die kein iNOS produzieren können. Der β -Aktin-Blot dient als Ladekontrolle und zeigt eine nahezu gleiche Proteinmenge bei allen Proben (s. Abb. 13).

3.4 Untersuchung des Probenmaterials aus Tieren

Zur Untersuchung des Einflusses einer Infektion mit RCMV-wt, RCMV- Δ CD200, RCMV-revCD200 auf die Expression der Gene CD200, vCD200, CD200R und des Makrophagenmarkers iNOS wurde Probenmaterial aus Ratten des Sprague-Dawley Stamms *ex vivo* untersucht. Aus dem Peritoneum isolierte Makrophagen wurden in der Durchflusszytometrie analysiert, wobei durch Betrachtung des Enzyms iNOS Erkenntnisse über den Aktivierungszustand peritonealer Makrophagen am Infektionsort gewonnen werden sollten. Aus der Milz und den peritonealen Exsudatzellen wurde DNA und RNA isoliert, um im Anschluss die Transkription der viralen Gene vCD200 und Glykoprotein B (gB), sowie der zellulären Gene c-myc, iNOS, CD200 und CD200R mithilfe der TaqMan-PCR zu untersuchen. Ein Virusnachweis bei infizierten Tieren erfolgte über Virus-Titration in den Organen Leber und Milz.

Die Tiere sind nach dem in Abb. 15 gezeigten Schema intraperitoneal infiziert worden. Jede Gruppe bestand aus fünf Tieren. Mit dem Probenmaterial wurden die aufgelisteten Versuche durchgeführt (s. Abb.15).

Bevor die angegebenen Untersuchungen mithilfe der Verfahren Durchflusszytometrie und TaqMan-PCR aus dem Probenmaterial der Tiere durchgeführt werden konnten, mussten zunächst einige Etablierungsschritte erfolgen, die im Anschluss beschrieben werden.

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7
Virus	Nicht infiziert	RCMV-wt	RCMV- Δ CD200	RCMV-revCD200	RCMV-wt	RCMV- Δ CD200	RCMV-revCD200
† Tage nach Infektion	0	2	2	2	6	6	6
Leber und Milz	<ul style="list-style-type: none"> Titration der Organe zur Bestimmung des Virustiters 						
Milz	<ul style="list-style-type: none"> Extraktion von DNA zur Bestimmung der Viruslast mithilfe der gB-Sonde in der TaqMan-PCR Extraktion von RNA und anschließende cDNA-Synthese zur Bestimmung der Transkriptionsstärke der Gene vCD200, CD200, CD200R, iNOS und c-myc 						
Peritoneale Exsudatzellen (PEZ)	<ul style="list-style-type: none"> Extraktion von RNA und anschließende cDNA-Synthese zur Bestimmung der Transkriptionsstärke der Gene vCD200, CD200, CD200R, iNOS und c-myc <ul style="list-style-type: none"> Durchflusszytometrie mithilfe der Antikörper α-iNOS und α-OX41 						

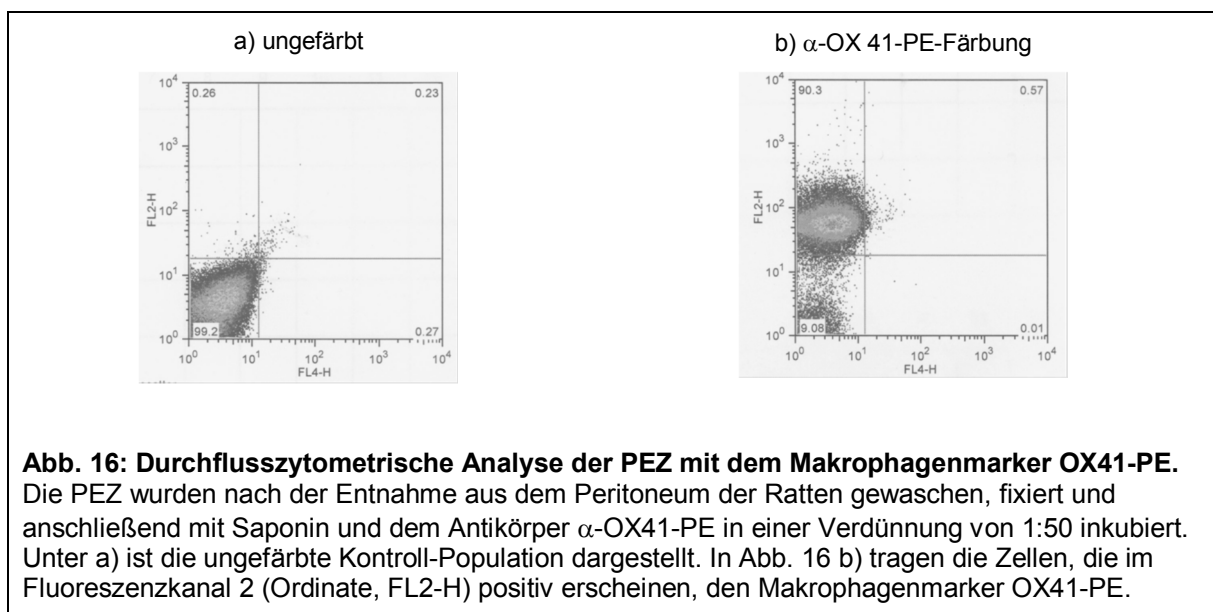
Abb. 15: Versuchsübersicht und verwendetes Probenmaterial.

3.4.1 Biotinylierung und Antikörper-Titration für die Durchflusszytometrie

Zur Untersuchung PEZ mussten die verwendeten Antikörper zunächst getestet und titriert werden. Dies wurde mithilfe der Makrophagenzelllinie NR 8383 und den PEZ durchgeführt. Da es sich bei den PEZ um ein Zellgemisch aus Makrophagen, Granulozyten und anderen Monozyten handelt, wurde als Makrophagenmarker das OX-41-Antigen eingesetzt. Makrophagen exprimieren Fc-Rezeptoren, die Antikörper über die Speziesgrenze hinaus binden können, wodurch es bei der Färbung zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann. Um das Auftreten unspezifischer Bindungen zu verhindern, wurden die Zellen vor der eigentlichen Färbung mit 50 μ l Fc-Block (1:1 gemischt mit Mausserum) inkubiert, um eine Sättigung der Fc-Rezeptoren zu erreichen. Zusätzlich zur Färbung der beiden Oberflächenproteine CD200-Rezeptor (CD200R) und des OX-41-Antigens wurde auch eine intrazelluläre Färbung zum Nachweis von iNOS durchgeführt. Die Zellen wurden dazu mit 2.5 % Formaldehyd fixiert und mit 2 % Saponin permeabilisiert. Es wurde geprüft, ob die Fixierung bzw. Permeabilisierung der Zellen Einfluss auf die Bindung der oberflächenspezifischen Antikörper hatte. Die unterschiedlichen Antikörper wurden später in Doppelfärbungen eingesetzt, weshalb eine Überprüfung des Verhaltens aller verwendeten Antikörper auf eine Fixierung bzw. Permeabilisierung durchgeführt wurde.

3.4.1.1 Titration des Makrophagenantikörpers für die Durchflusszytometrie

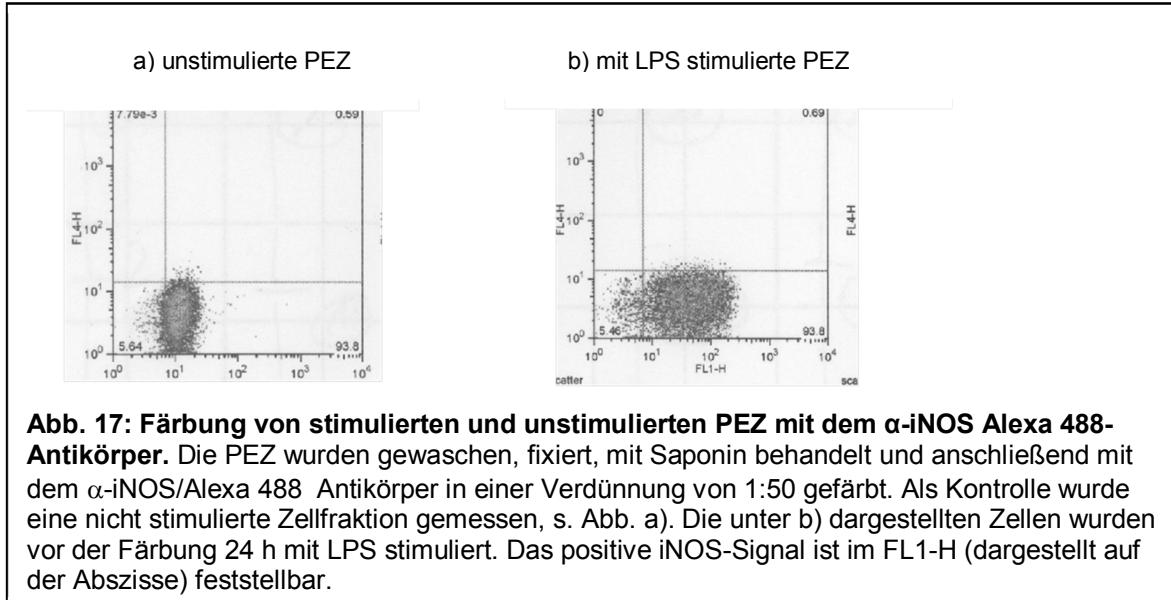
Der α -OX41-PE Antikörper ist gegen das Oberflächenantigen CD172a der Ratte gerichtet, welches auf myeloiden und dendritischen Zellen exprimiert wird. Dieser Antikörper wurde als PE-Konjugat eingesetzt und als Makrophagenmarker für die PEZ verwendet. Da es sich bei den PEZ um ein Gemisch von Zelltypen handelt, wurde dieser Makrophagenmarker zur Differenzierung verwendet. Die Titration des Antikörpers ergab, dass eine Verdünnung von 1:50 für eine Färbung der Zellen ausreichend ist. In der Abb. 16 a) ist eine ungefärbte Population von PEZ gezeigt. In Abb. 16 b) sind die Zellen abgebildet, die in einer Verdünnung von 1:50 mit dem Antikörper inkubiert worden sind. Die 90.3 % der im FLH-2 positiven Zellen entsprechen dem Anteil der Makrophagen in den untersuchten PEZ, denn sie tragen das OX-41-Antigen (s. Abb. 16 b, OX-41-PE-Färbung).



3.4.1.2 Titration des iNOS-Antikörpers für die Durchflusszytometrie

Der zum Nachweis der Makrophagen-Aktivierung verwendete α -iNOS/Alexa 488 Antikörper musste für den Einsatz in der Durchflusszytometrie titriert werden. Zur Titration des Antikörpers wurden sowohl die Makrophagenzelllinie als auch PEZ verwendet. Für die weiteren Versuche wurde der Antikörper für beide Zelltypen in einer Verdünnung von 1:50 verwendet. Als Positivkontrolle wurde eine Fraktion der Zellen mit LPS stimuliert. Dies führt zu einer in der Durchflusszytometrie feststellbaren iNOS-Aktivierung der Zellen (in Abb. 17 b gezeigt für die PEZ). Bei den nicht stimulierten PEZ konnte in der Durchflusszytometrie eine basale iNOS-Aktivität nachgewiesen werden (s. Abb. 17 a). Dies entspricht den in Abb. 12 gezeigten Ergebnissen des α -iNOS Western Blots. Dort konnte eine basale iNOS-Aktivität auch bei der Makrophagenzelllinie gezeigt werden.

Als Sekundärantikörper wurde ein α -Ziege-Alexa 488 in einer Verdünnung von 1:200 verwendet. Der Sekundärantikörper Alexa 488 zeigte keine unspezifischen Bindungen oder eine Hintergrundfluoreszenz.



3.5 *iNOS-Expression der peritonealen Makrophagen ex vivo*

Nach Etablierung der durchflusszytometrischen Messungen wurden PEZ der RCMV-wt, RCMV- Δ CD200 und RCMV-revCD200 infizierten sowie der mock-infizierten Tiere untersucht. Die Einteilung der Tiere, deren Gewebeproben untersucht wurden, ist in Abb. 15 dargestellt. Die PEZ wurden entnommen, gewaschen (s. 2.2.29) und mit den Antikörpern α -OX-41-PE (Makrophagenmarker) und α -iNOS-Alexa 488 (Makrophagen-Aktivierungsmarker) inkubiert. Es wurde eine Einzelfärbung sowie eine Doppelfärbung der beiden Antikörper durchgeführt (s. 2.2.28). Außerdem wurde folgende Färbungen zur Kontrolle durchgeführt: eine Einzelfärbung von Zellen mit dem Sekundärantikörper Alexa 488 sowie eine ungefärbte Zellpopulation pro Färbung. Die PEZ aller Versuchstiere wurden gefärbt und in der Durchflusszytometrie untersucht. In Abb. 18 ist für die Gruppe 1 (mock-infizierte Tiere) und die Gruppen 2 bis 4 (zwei Tage nach Infektion) jeweils ein Tier als charakteristischer Vertreter der Gruppe ausgewählt und dargestellt worden. Die peritonealen Exsudatzellen innerhalb der Gruppen zeigten eine homogene Färbung.

Unabhängig davon mit welchem Virus die Tiere infiziert wurden, zeigten die PEZ, die aus den infizierten Tieren stammten, eine vermehrte iNOS-Produktion im Vergleich zu den mock-infizierten Tieren (Abb. 18 c). Bei den Tieren die mit RCMV-revCD200 infiziert worden sind, fand eine vergleichsweise geringere iNOS-Produktion statt (s. Abb. 18 IV c).

Die Färbung der PEZ von Tieren nach sechstägiger Infektion mit den Viren zeigte ein nahezu gleiches Ergebnis wie die dargestellten Ergebnisse der Tiere nach zweitägiger Infektion mit den Viren, weshalb auf eine Darstellung verzichtet wurde.

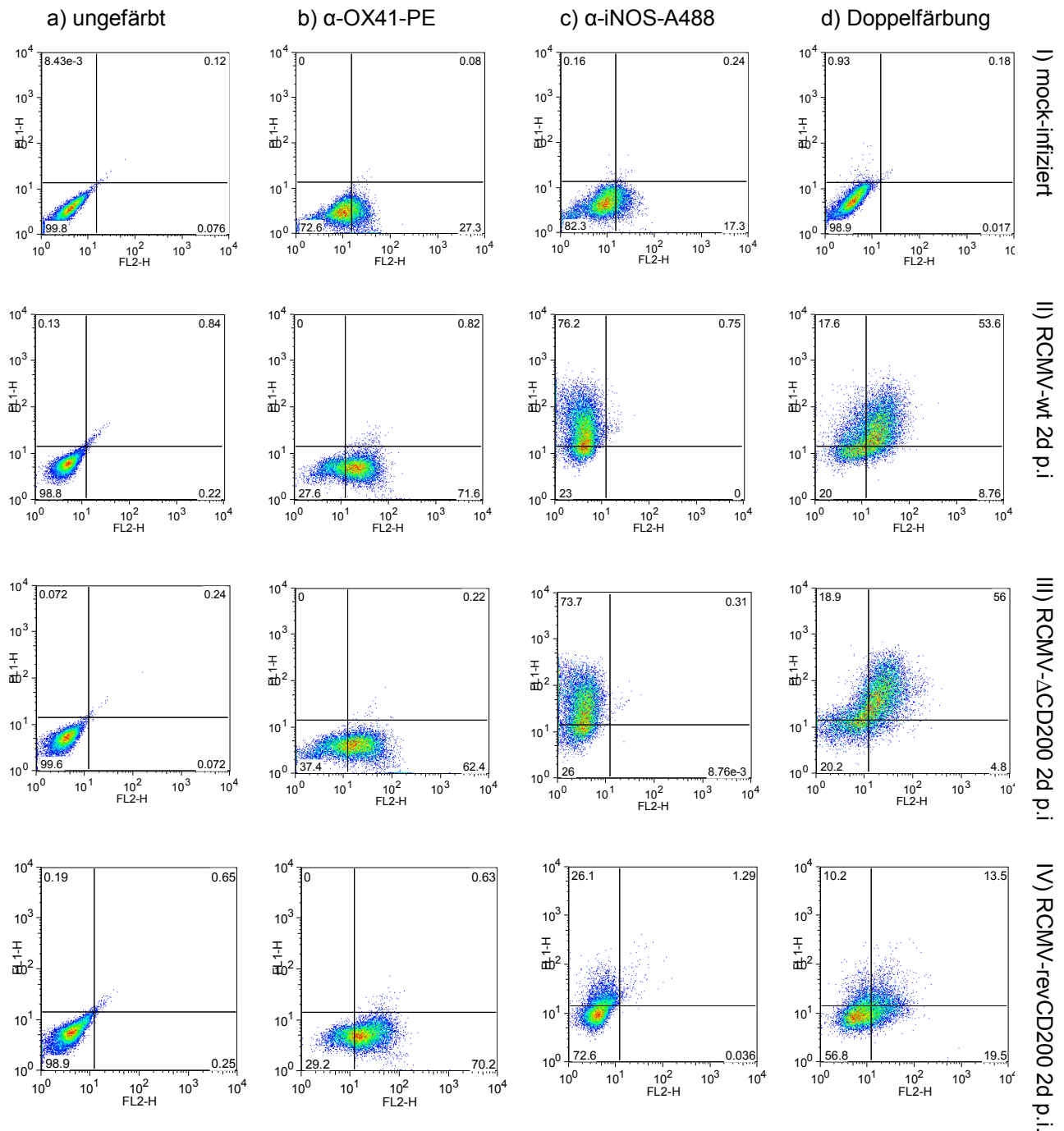
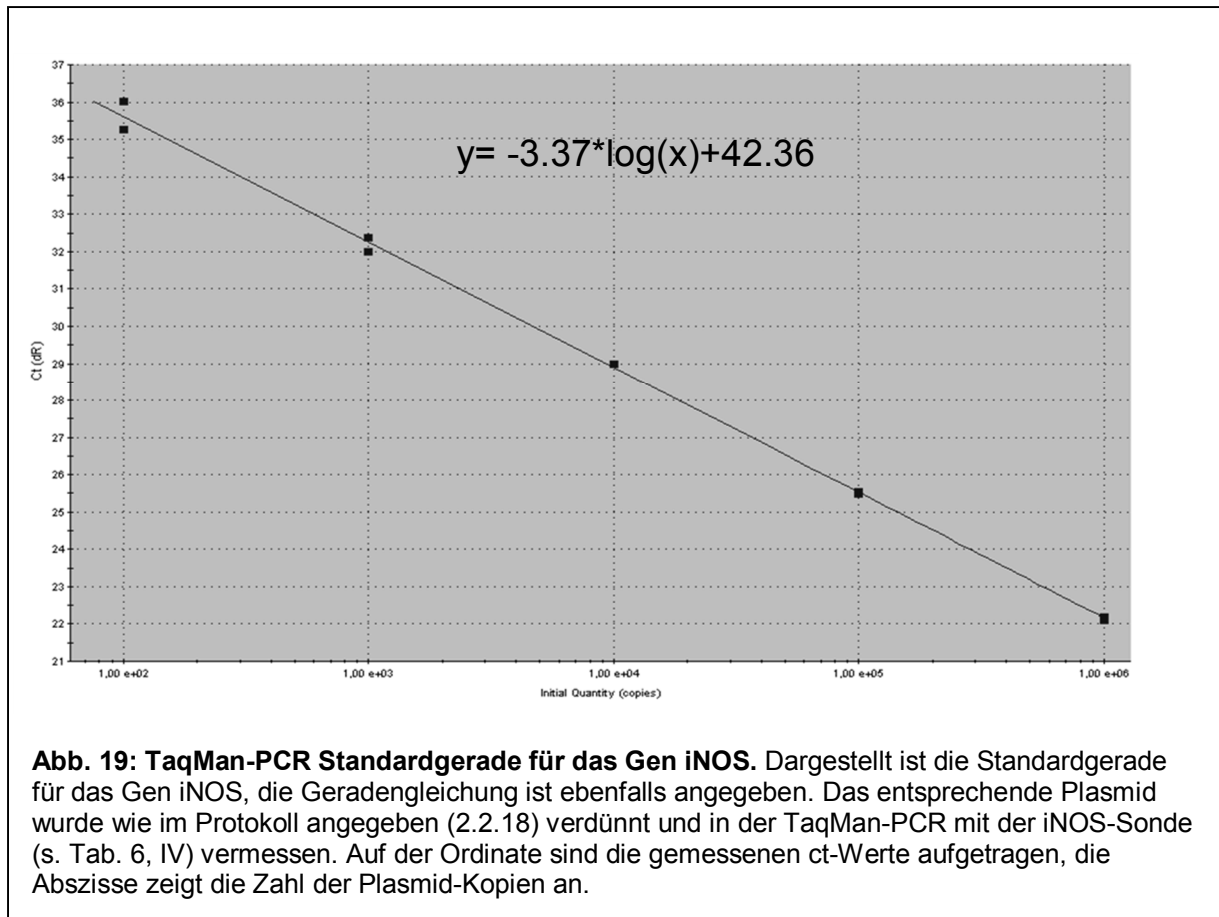


Abb. 18: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen der PEZ zwei Tage nach der Infektion. Die Zellen stammten aus dem Ratten-Peritoneum und wurden gewaschen, die Erythrozyten lysiert und anschließend mit den angegebenen Antikörpern inkubiert. Die Ergebnisse jeweils eines Tieres aus jeder Gruppe zwei Tage p.i. sind exemplarisch dargestellt (I-IV). Unter a) ist die ungefärbte Zellpopulation, unter b) die Färbung der Zellen mit dem Makrophagenmarker (α -OX41-PE), unter c) die Färbung der Zellen mit dem Makrophagen-Aktivierungsmarker (α -iNOS/A488) und unter d) die Doppelfärbung (α -OX41-PE und α -iNOS/A488) dargestellt. Die in der Spalte b) gezeigten Färbungen, die im FL2 positiv sind, tragen den Makrophagenmarker. Die in der Spalte c) im FL1-H positiven Zellen zeigen eine iNOS-Expression. Bei der Doppelfärbung in Spalte d) ist der FL1-H gegen FL2-H aufgetragen und die Zellen, die sowohl für den Makrophagenmarker als auch den Makrophagen-Aktivierungsmarker positiv sind, sind im oberen rechten Quadranten abgebildet.

3.6 Quantitativer Nachweis von vCD200, CD200, CD200R und iNOS

3.6.1 Etablierung der Standardreihen

In den folgenden Untersuchungen sollte der Einfluß des viralen CD200-Homologes des RCMV-E auf die Transkription von iNOS auf cDNA-Ebene untersucht werden. Zusätzlich wurde die Transkription der Gene CD200, vCD200 und CD200R betrachtet. Zu diesem Zweck wurden TaqMan-PCRs entwickelt. Zur Etablierung von Standardreihen wurden zunächst die Plasmid-Konstrukte kloniert. Die Plasmide für die Gene c-myc und Glykoprotein B (TOPO-gB und TOPO-c-myc) waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden (s. Tab. 4). Das gB-Gen ist Bestandteil der Hüllmembran des Virus und die Messung dient dem Nachweis genomischer Virus-DNA. c-myc stellt das sogenannte „housekeeping-Gen“ dar, zu dem die Messungen von iNOS, CD200, vCD200 und CD200R ins Verhältnis gesetzt wurden (s. 2.2.18). Für die nachzuweisenden Gene wurde zunächst das Amplifikat das detektiert werden sollte mit den in Tab. 5, Nr. 1-8 aufgeführten Primern durch PCR gewonnen und anschließend in den TOPO-Vektor kloniert (s. 2.2.16). Alle neu hergestellten Plasmide (TOPO-vCD200, TOPO-CD200, TOPO-CD200R und TOPO-iNOS; siehe Tab. 4) wurden sequenziert und es wurden Vektor-Karten (s. Anhang 7) erstellt. Die Etablierung der Standardreihe erfolgte für jedes Gen einzeln. Für eine spätere Quantifizierung der erhaltenen Messwerte wurde eine Standardkurve in einem Bereich von 1×10^6 bis 1×10^0 Plasmide (s. 2.2.18) benötigt. Beispielhaft ist die für das Gen iNOS etablierte Standardgerade in Abb. 19 gezeigt. Alle anderen Standardreihen sowie die Rohdaten befinden sich im Anhang der Arbeit (s. Anhang 8). In der PCR verdoppelt sich bei jedem Zyklus die Zahl der Amplifikate, somit ist eine Verzehnfachung der Kopien nach 3.33 Zyklen erreicht. Daraus ergibt sich im Idealfall eine Steigung der angegebenen Geradengleichung von -3.33. Über die Abweichung von diesem Idealwert kann die Effizienz der PCR bestimmt werden. Wie in der angegebenen Geradengleichung zu erkennen, konnte bei der gezeigten Standardkurve eine nahezu optimale Effizienz (-3.37) der PCR erreicht werden (s. Abb. 19). In der Standardgeraden wurden die Verdünnungen entsprechend 1×10^6 bis 1×10^2 Kopien dargestellt. Die entsprechenden Verdünnungen wurden bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert, um gegebenenfalls die Standardreihe wiederholen zu können. Bei den später erfolgten Messungen der Proben wurde immer die 10^3 -Verdünnung des jeweiligen Plasmids als Positivkontrolle mitgeführt. Die Zyklusanzahl betrug bei allen durchgeführten TaqMan-PCRs 45 Zyklen.



3.6.2 Optimierung der cDNA-Synthese für die RealTime-PCR

Die cDNA-Synthese wurde im Rahmen der Aufarbeitung der Tierproben in einem Schritt durchgeführt. Zunächst wurde die RNA der Proben nach dem Standard-Protokoll (Drei-Schritt cDNA-Synthese) bearbeitet (s. Tab. 8) und im Anschluss eine Real-Time PCR mit der cDNA dieser Proben durchgeführt. Die hierbei erreichten ct-Werte wurden bei der Etablierung der Ein-Schritt-cDNA-Synthese (s. Tab. 9) als Referenzwerte verwendet. Es zeigte sich, dass die Ein-Schritt-cDNA-Synthese eine höhere Sensitivität aufwies, was an den verbesserten ct-Werten zu erkennen ist (s. Abb. 20), so dass die cDNA-Synthese im Anschluss nach dem Ein-Schritt-Protokoll erfolgte.

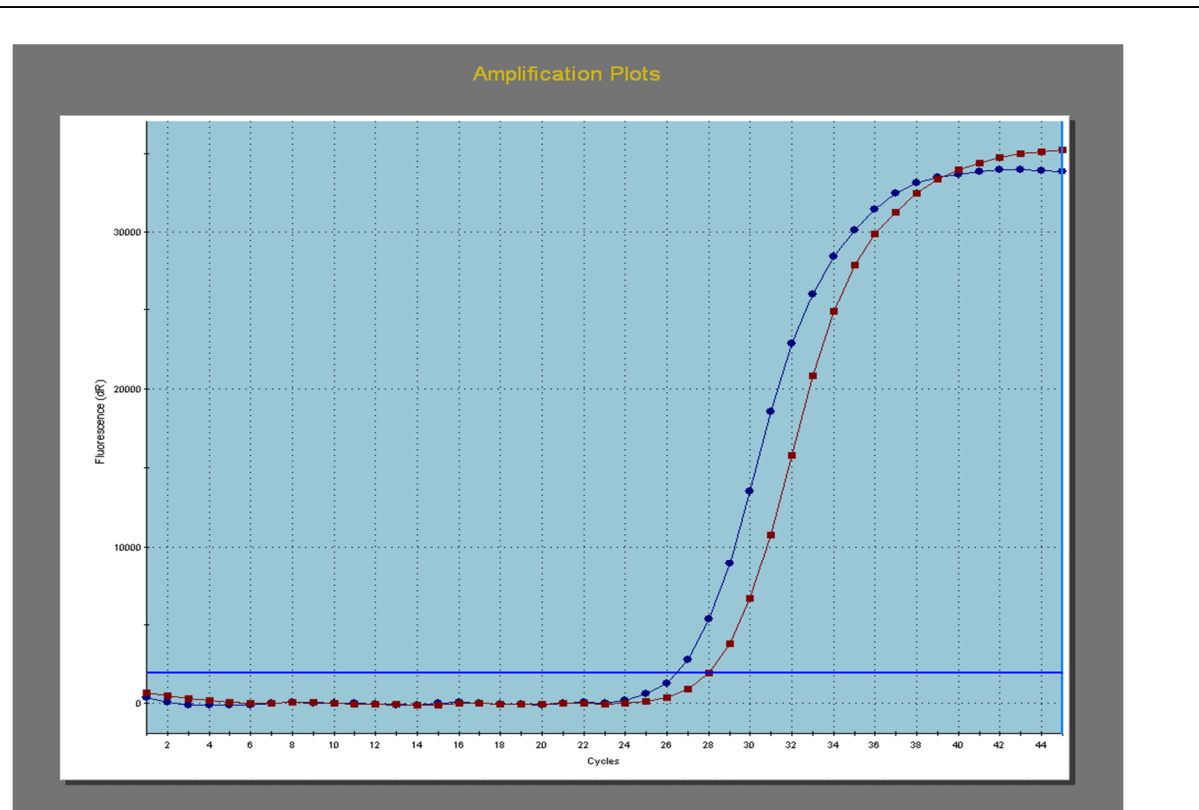
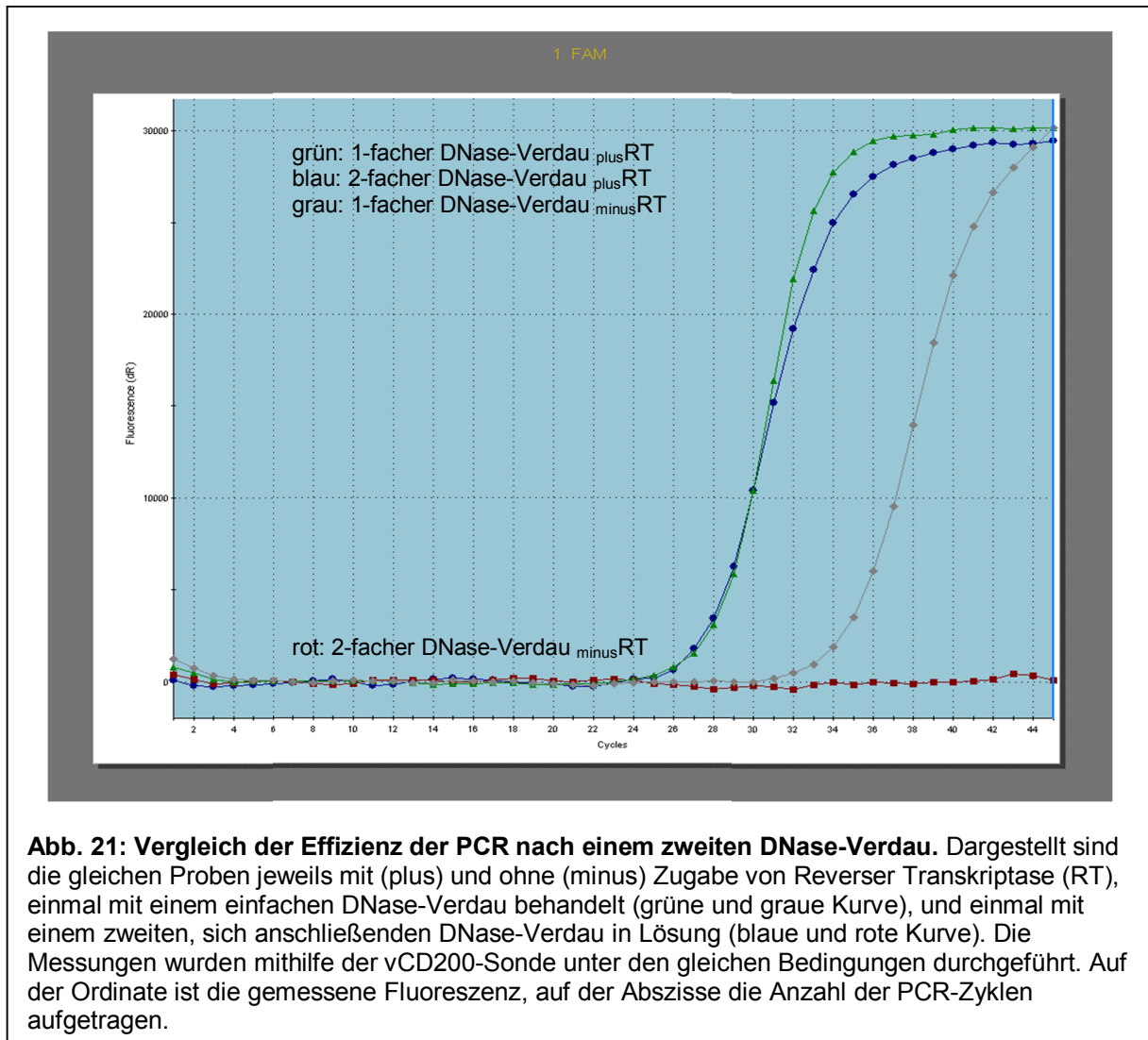


Abb. 20: Effizienz der etablierten Ein-Schritt-cDNA-Synthese im Vergleich zum Standard-Protokoll. Die aus der Milz eines Tieres isolierte RNA wurde mithilfe des Kits „First Strand cDNA Synthesis Revert AID Minus M-MuLV Reverse Transkriptase“ in cDNA umgeschrieben. Zunächst wurde dazu das drei Schritte enthaltene Standard-Protokoll (rote Kurve) verwendet, und im Vergleich ein Ein-Schritt-Protokoll (blaue Kurve) etabliert. Nach der Synthese wurden die Proben unter den gleichen Bedingungen mit der c-myc-Sonde (s. Tab. 6, I) in der TaqMan-PCR vermessen. Auf der Ordinate ist die gemessene Fluoreszenz, auf der Abszisse die Anzahl der PCR-Zyklen aufgetragen.

Im Rahmen der Isolierung von RNA aus Organen und der sich anschließenden cDNA-Synthese zeigte sich, dass genomische DNA amplifiziert wurde. Es konnte auch in den minusRT -Proben ein Signal in der TaqMan-PCR gefunden werden (s. Abb. 21), während die Negativ-Kontrollen (Proben ohne cDNA) kein Signal zeigten. Dies ließ auf eine Kontamination der cDNA mit genomischer DNA schließen.

Um die Kontamination zu minimieren, wurde zusätzlich zum DNase-Verdau auf der Säule ein DNA-Verdau in Lösung durchgeführt (s. 2.2.10). Die cDNA-Synthese und Vermessung der Proben mithilfe der TaqMan-PCR erfolgte wie oben beschrieben. Es traten im weiteren Verlauf der Messungen keine Kontaminationen mit genomischer DNA mehr auf. Die Effizienz der PCR war gleichbleibend, die ct-Werte zeigten zu vernachlässigende Unterschiede zu den vorher durchgeführten Messungen mit nur einem DNase-Verdau (s. Abb. 21).



3.7 Bestimmung der Viruslast in der Milz

Nach erfolgreicher Etablierung der TaqMan-PCR wurden die Messungen mit dem Probenmaterial aus den Tieren durchgeführt. Die Tiere der Gruppen 2 bis 7 (s. Abb. 15) waren für zwei bzw. sechs Tage mit RMCV-wt, RCMV- Δ CD200 und RCMV-revCD200 infiziert worden. Die Tiere der Gruppe 1 dienten als Kontrollgruppe und wurden mock-infiziert.

Die Viruslast der Tiere wurde auf DNA-Ebene mithilfe der TaqMan-PCR in der Milz und durch Virustitration (s. 2.2.7) in der Milz und der Leber bestimmt. In der TaqMan-PCR erfolgte die Bestimmung der Virusmenge über eine spezifische Sonde für das gB-Gen. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen aus jeder Probe durchgeführt. Ct-Werte über 40 wurden nicht berücksichtigt und als negativ gewertet, da die verwendete Standardreihe in

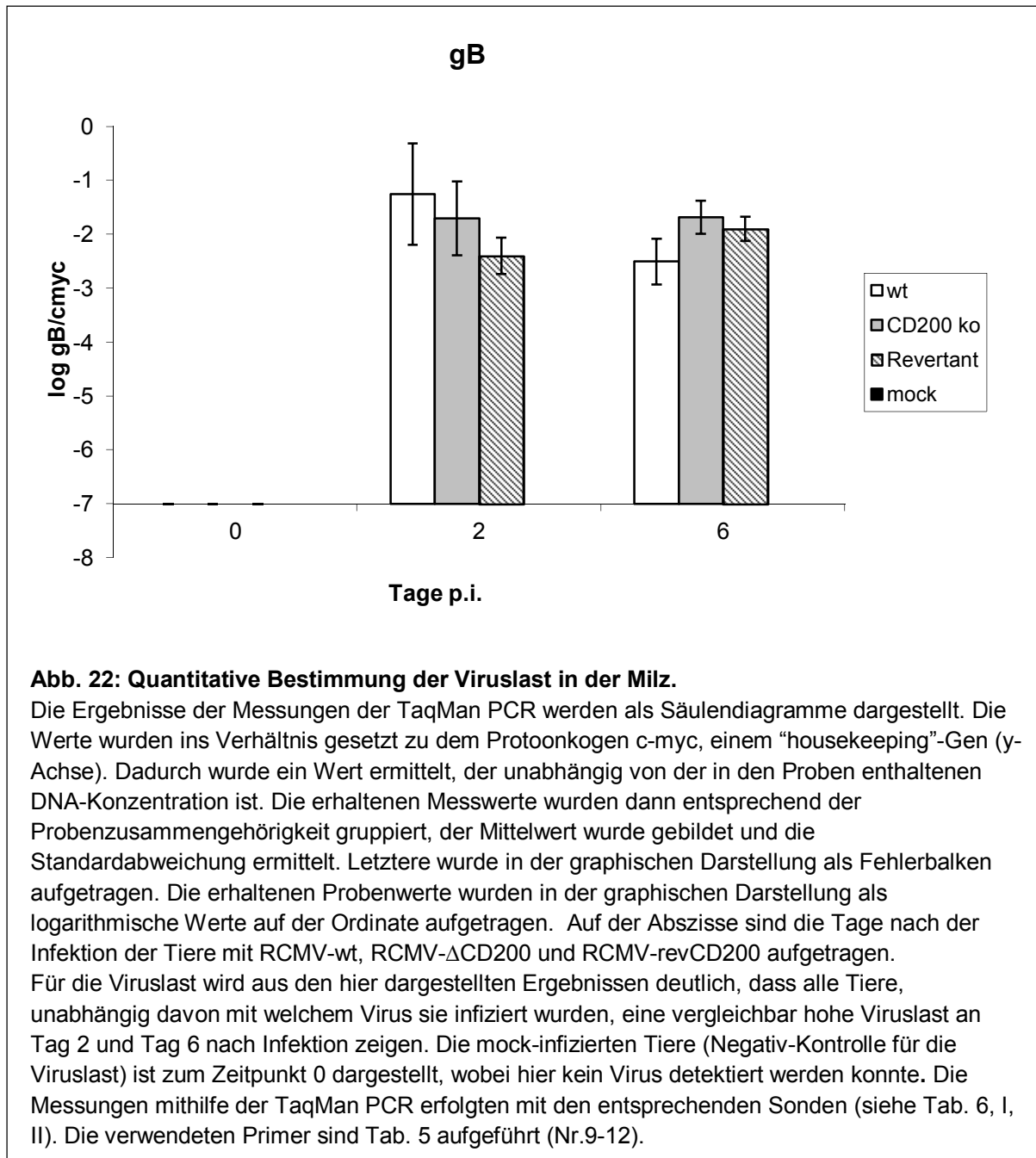
diesem Bereich keine verlässlichen Daten mehr erwarten ließ. Zur Bestimmung von gB wurde DNA aus der Milz extrahiert und konnte in der Milz zu allen untersuchten Zeitpunkten nach Infektion der Tiere mit RCMV-wt, RCMV- Δ CD200 und RCMV-revCD200 nachgewiesen werden. Innerhalb und auch zwischen den Gruppen zeigten sich nur geringe Abweichungen (s. Abb. 22). Die Ergebnisse für die klassische Virustitration (s. 2.2.7) sind in Tab. 19 dargestellt. Bei einzelnen Tieren (in der Tabelle mit einem “-“ gekennzeichnet) waren die Titrations-Platten nicht auszählbar. Sechs Tage nach Infektion der Tiere waren bei der Titration von Leber und Milz keine Plaques sichtbar. Mithilfe der TaqMan-PCR konnte zu diesem Zeitpunkt noch Virus-DNA in der Milz nachgewiesen werden (s. Abb. 22).

Tab. 19: Ergebnisse der Virustitration aus der Leber und Milz 2d p.i.

Tierbezeichnung /Virus	Ergebnisse Titration Leber	Ergebnisse Titration Milz
SD 6 RCMV-wt	1.5×10^{-3}	1×10^{-3}
SD 7 RCMV-wt	5×10^{-2}	1.25×10^{-3}
SD 8 RCMV-wt	-	1.75×10^{-5}
SD 9 RCMV-wt	1.0×10^{-4}	1.0×10^{-3}
SD 10 RCMV-wt	2.3×10^{-3}	1.0×10^{-4}
SD 11 RCMV- Δ CD200	5×10^{-2}	7.5×10^{-2}
SD 12 RCMV- Δ CD200	3.6×10^{-3}	-
SD 13 RCMV- Δ CD200	-	2.0×10^{-4}
SD14 RCMV- Δ CD200	4.5×10^{-3}	2.5×10^{-3}
SD 15 RCMV- Δ CD200	-	-
SD 16 RCMV-revCD200	1.5×10^{-4}	1.25×10^{-3}
SD 17 RCMV-revCD200	2.0×10^{-3}	2.25×10^{-4}
SD 18 RCMV-revCD200	-	2.0×10^{-3}
SD 19 RCMV-revCD200	5×10^{-3}	-
SD 20 RCMV-revCD200	5×10^{-2}	1.15×10^{-3}

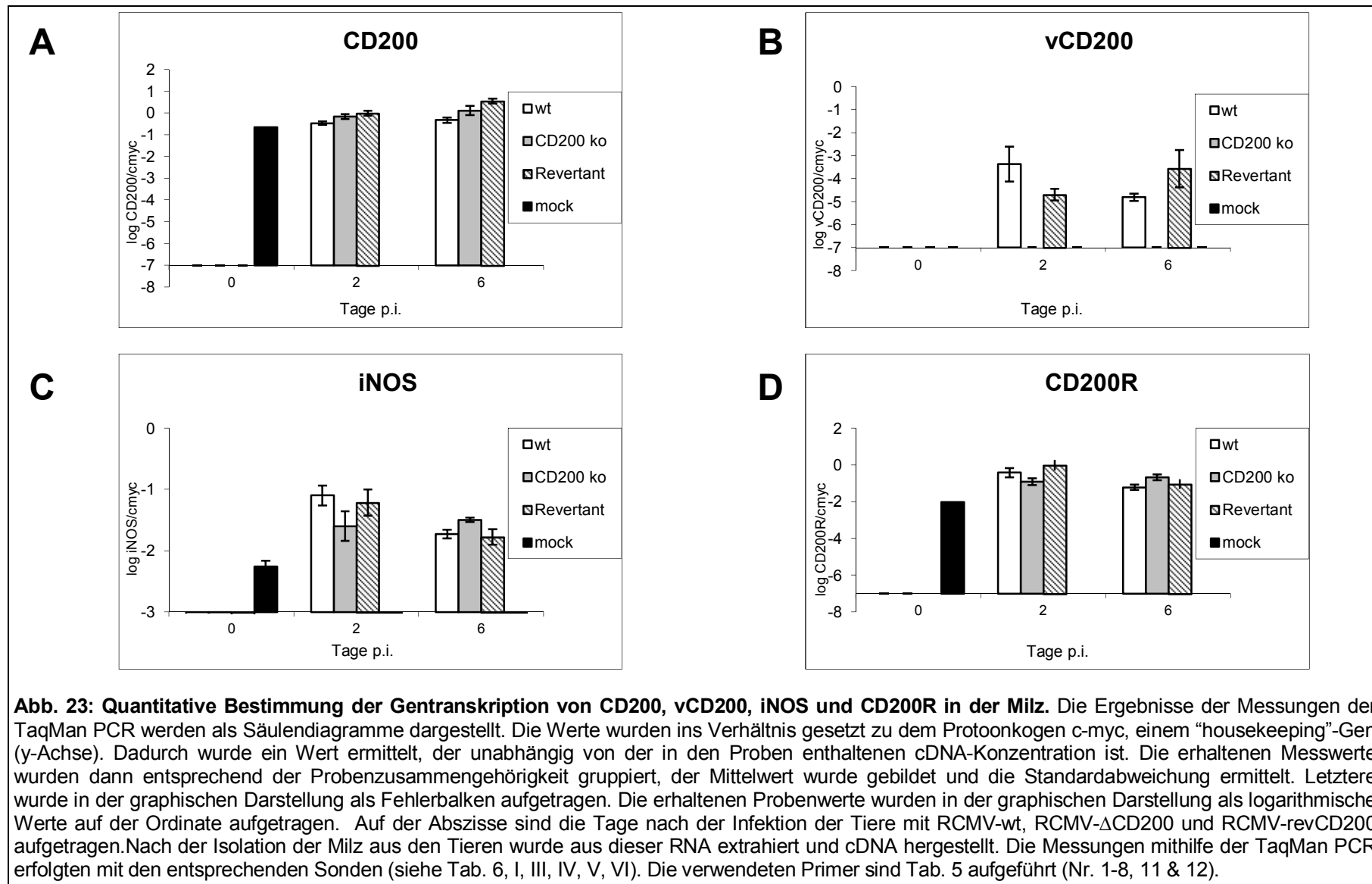
Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die intraperitoneale Infektion der Tiere mit 1×10^7 Viren zu einer Infektion der Tiere geführt hat, da zwei Tage nach der Infektion das Virus durch Titration nachgewiesen werden konnte (s. Tab. 19), und zwei und sechs Tage nach der Infektion die DNA für das Virushüllprotein gB in der Milz nachzuweisen war (s. Abb. 22).

Bei den Tieren der Kontrollgruppe, die kein Virus injiziert bekamen, konnte in der Milz und der Leber bei der klassischen Organtitration kein Virus nachgewiesen werden. In der TaqMan-PCR der Milz sind die Ergebnisse dieser Gruppe zum Zeitpunkt 0 dargestellt und es konnte ebenfalls keine DNA für das Virushüllprotein gB detektiert werden (s. Abb. 22).



3.7.1 Untersuchung der Gentranskription von vCD200, CD200, CD200R und iNOS in der Milz und peritonealen Makrophagen

In den folgenden Untersuchungen sollten mithilfe der TaqMan-PCR quantifizierbare Ergebnisse zum Einfluß einer Infektion der Tiere mit RCMV-wt, RCMV- Δ CD200 und RCMV-revCD200 auf die Transkription der zellulären Gene CD200, CD200R und iNOS und des viralen Gens vCD200 in der Milz und den peritonealen Makrophagen gewonnen werden. Die Messungen wurden mit cDNA durchgeführt.



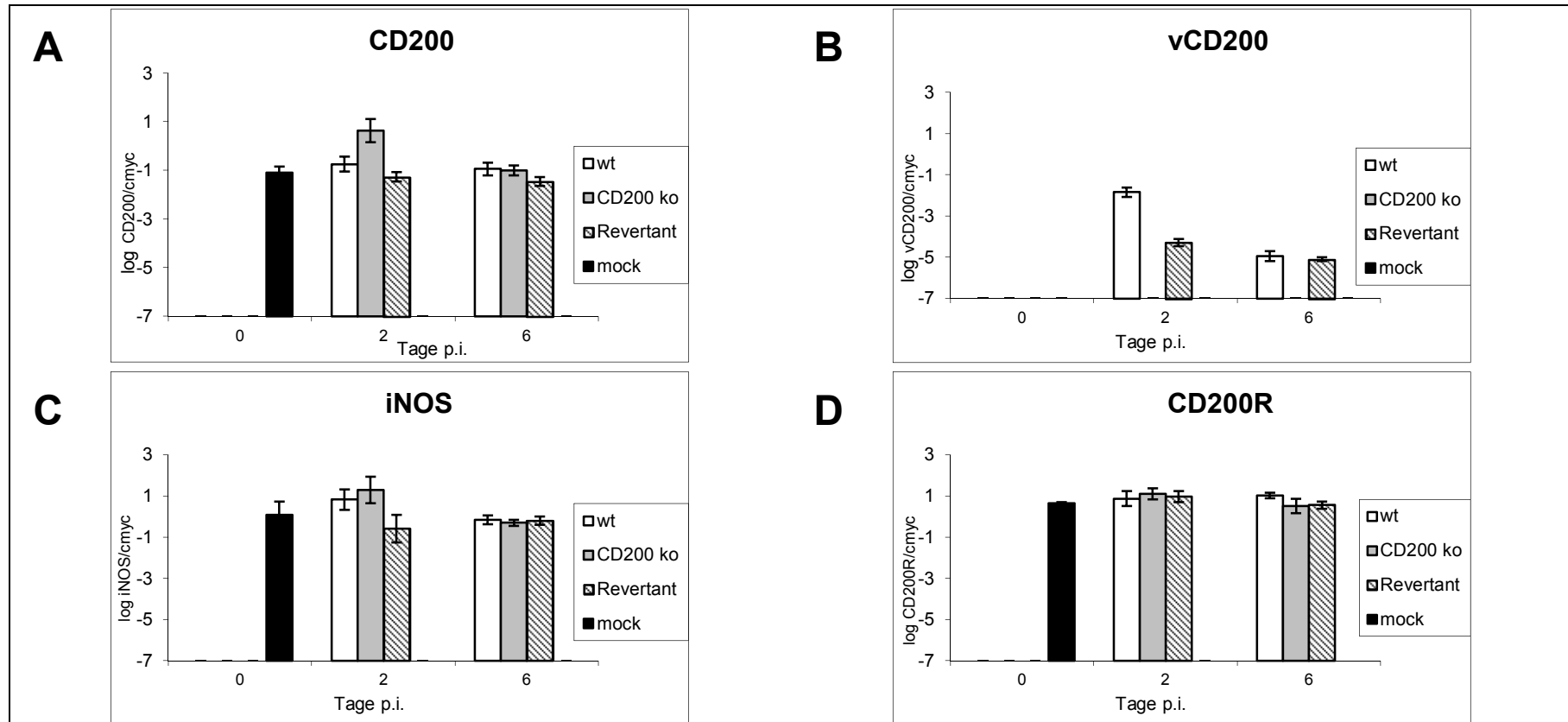


Abb. 24: Quantitative Bestimmung der Gentranskription von CD200, vCD200, iNOS und CD200R in peritonealen Makrophagen. Die Ergebnisse der Messungen der TaqMan PCR werden als Säulendiagramme dargestellt. Die Werte wurden ins Verhältnis gesetzt zu dem Protoonkogen c-myc, einem "housekeeping"-Gen (y-Achse). Dadurch wurde ein Wert ermittelt, der unabhängig von der in den Proben enthaltenen cDNA-Konzentration ist. Die erhaltenen Messwerte wurden dann entsprechend der Probenzusammengehörigkeit gruppiert, der Mittelwert wurde gebildet und die Standardabweichung ermittelt. Letztere wurde in der graphischen Darstellung als Fehlerbalken aufgetragen. Die erhaltenen Probenwerte wurden in der graphischen Darstellung als logarithmische Werte auf der Ordinate aufgetragen. Auf der Abszisse sind die Tage nach der Infektion der Tiere mit RCMV-wt, RCMV- Δ CD200 und RCMV-revCD200 aufgetragen. Nach der Isolation der Milz aus den Tieren wurde aus dieser RNA extrahiert und cDNA hergestellt. Die Messungen mithilfe der TaqMan PCR erfolgten mit den entsprechenden Sonden (siehe Tab. 6, I, III, IV, V, VI). Die verwendeten Primer sind Tab. 5 aufgeführt (Nr. 1-8, 11 & 12).

Im Rahmen der Messungen wurde festgestellt, dass die Transkription des Gens CD200R in der Milz und den PEZ unabhängig von der Infektion durch RCMV-wt, RCMV- Δ CD200 und RCMV-revCD200 ist (s. Abb. 23 D und 24 D).

In Abb. 23 A und 24 A wird deutlich, dass die Ergebnisse der Messungen für CD200 in der Milz und PEZ unbeeinflusst von einer Infektion mit den Viren sind (vgl. Abb. 9).

Die Quantifizierung des viralen Gens vCD200 in der Milz und den PEZ sind in Abb. 23 B und 24 B dargestellt. Die mock-infizierten Tiere stellen beim Nachweis dieses Gens die Negativkontrolle dar, und eine Amplifikation des viralen Gens erfolgt dort nicht. Ebenso ist keine Amplifikation des vCD200-Gens bei den Tieren festzustellen, die mit RCMV- Δ CD200 infiziert worden sind, da dieses Gen in dem Virus deletiert wurde. In der Milz bei den mit RCMV-wt und RCMV-revCD200 infizierten Tieren erfolgt zwei Tage und sechs Tage nach Infektion eine vergleichbare Transkription des vCD200. Für die PEZ zeigen sich die höchsten vCD200-Messwerte zwei Tage nach Infektion mit RCMV-wt (s. Abb. 24 B). Die ct-Werte der Messungen für das virale Gen vCD200 liegen unter den Werten die für die Transkription der zellulären Gene bestimmt wurden (vgl. Abb. 23 und 24 Expressionslevel vCD200 zu CD200, CD200R und iNOS).

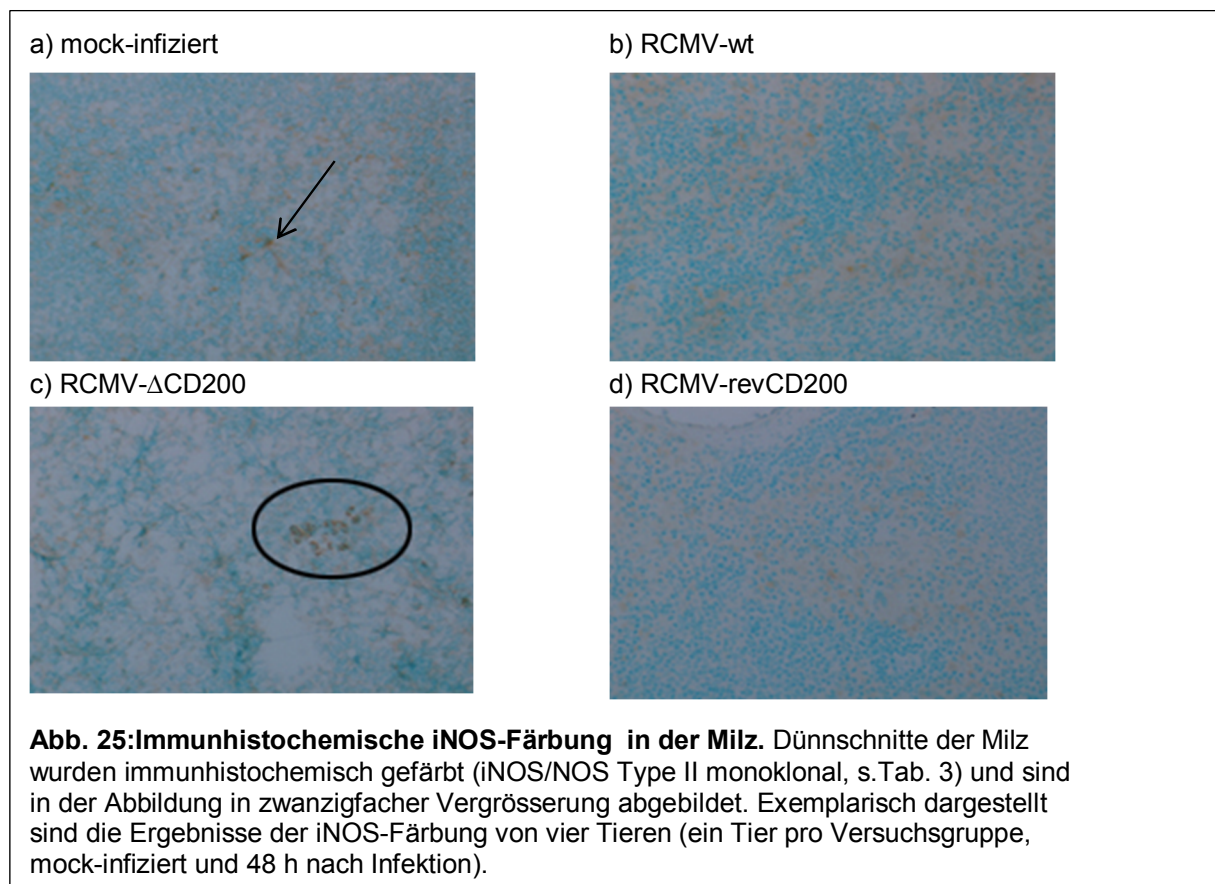
Bei der iNOS-Transkription in der Milz (s. Abb. 23 C) kann zwischen den infizierten und mock-infizierten Tieren nur ein geringer Unterschied festgestellt werden. Bei den PEZ (s. Abb. 24 C) ist der iNOS-Nachweis zwei Tage nach Infektion bei den mit RCMV- Δ CD200 infizierten Tieren am höchsten. Sowohl in den PEZ als auch in der Milz ist die basale Transkriptionsrate von iNOS bei den mock-infizierten Tieren vergleichbar mit der Transkriptionsrate dieses Enzyms bei den Virus-infizierten Tieren.

3.8 Immunhistochemische Färbung der Milzschnitte

Um den Aktivierungszustand der in der Milz befindlichen Makrophagen zu bestimmen, wurde eine immunhistochemische iNOS-Färbung des Gewebes durchgeführt. Die Färbungen wurden in Oxford im Labor von Prof. Neil Barclay vorgenommen. Als Positivkontrolle wurde die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen bestimmt, da diese konstitutiv in dem Gewebe exprimiert werden.

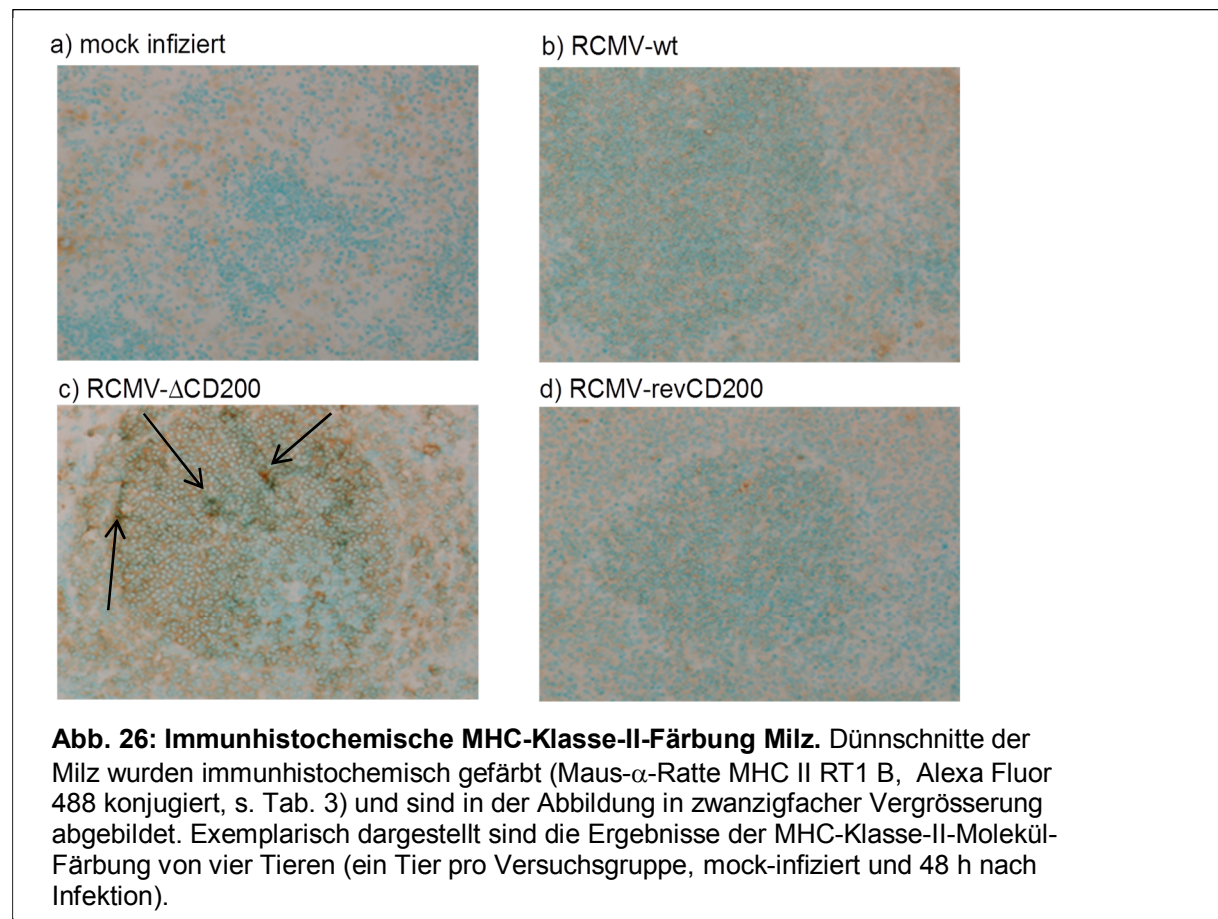
3.8.1 Expression des Enzyms iNOS in der Milz

Mithilfe der immunhistochemischen Färbung konnte kein Unterschied der iNOS-Expression nach Infektion mit RCMV-wt, RCMV- Δ CD200, RCMV-revCD200 und mock-infizierten Tieren in der Milz festgestellt werden. Der Nachweis der Produktion von iNOS erfolgte über eine Anfärbung der Protein-Antikörper Konjugate in den Zellen. Die rötliche Färbungen aller Milzschnitte zeigte eine gleiche, vergleichsweise niedrige Expression von iNOS (s. Markierung in Abb. 25 a und eingekreister Bereich in Abb. 25 c).



3.8.2 Unterschiedliche Expressionsstärke der MHC-Klasse-II-Moleküle in der Milz

Die MHC-Klasse-II-Färbung der Milzschnitte diente als Positivkontrolle, da diese Moleküle konstitutiv exprimiert werden. Der Nachweis der Produktion von MHC-Klasse II erfolgte über eine rötliche Anfärbung der Protein-Antikörper Konjugate in den Zellen. Bei dem dargestellten Milzschnitt eines mit RCMV- Δ CD200 infizierten Tieres ist eine stark vermehrte Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen (s. Markierungen Abb. 26 c) erkennbar. Dies konnte bei allen Milzschnitten der Tiere, die mit RCMV- Δ CD200 infiziert wurden, beobachtet werden. Bei den Tieren, die mit RCMV-wt und RCMV-revCD200 infiziert worden sind, war die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen vergleichbar mit der Expression bei den mock-infizierten Tieren (vgl. Abb. 26 a, b, d).



4 Diskussion

4.1 Herstellung und Charakterisierung einer RCMV CD200-Revertante

Ziel der Arbeit war die Charakterisierung des RCMV CD200-Homologs (vCD200) und die Überprüfung der unter 1.4 dargestellten Hypothese: die Interaktion von vCD200 (exprimiert von verschiedenen Zelltypen) und seinem Rezeptor (CD200R) auf Makrophagen führt zu einem inhibitorischen Signal in Makrophagen.

Bei vCD200 handelt es sich um ein Zelloberflächenmolekül, das nach Infektion mit RCMV-E exprimiert wird (s. Abb. 9) und an einen inhibitorischen Rezeptor (CD200R) auf Makrophagen bindet (Foster-Cuevas 2011). Die Deletionsmutante RCMV- Δ CD200 war in der Arbeitsgruppe vorhanden. Um auszuschließen, dass bei der homologen Rekombination im Rahmen der Herstellung von RCMV- Δ CD200 unerwünschte Mutationen innerhalb des RCMV-Genoms auftraten, die für einen veränderten Phänotyp verantwortlich sind, wurde eine Virusrevertante (RCMV-revCD200) hergestellt. RCMV-revCD200 gleicht dem RCMV Wildtyp-Virus (RCMV-wt) und dient dazu, Veränderungen des Infektionsverhaltens von RCMV- Δ CD200 auf den *knock-out* des vCD200-Gens zurückführen zu können.

Zur Herstellung rekombinanter Viren wird häufig die BAC (bacterial artificial chromosome)-Technologie eingesetzt (Messerle et al. 1997, Borst et al. 2007). Hierbei handelt es sich um ein künstliches bakterielles Chromosom, das in der Lage ist virale DNA stabil aufzunehmen. Da zum Zeitpunkt der Herstellung des RCMV- Δ CD200 Virus in der Arbeitsgruppe noch kein RCMV-BAC vorlag, wurde dieses Virus durch homologe Rekombination hergestellt. Bei dieser Methode wird ein Markergen, beispielsweise der *lacZ*-Leserahmen in das Virus eingefügt, um dadurch eine spätere Selektion zu ermöglichen. RCMV- Δ CD200 besitzt einen solchen *lacZ*-Leserahmen. Sowohl die Herstellung von Deletionsmutanten als auch die Insertion des *lacZ*-Leserahmens als Marker wurde auch in Studien zu HCMV durchgeführt. Ebenso wie dort beschrieben, erfolgte in der vorliegenden Arbeit eine Überprüfung der hergestellten rekombinanten Viren mithilfe der β -Galaktosidase-Reportergen-Aktivität des eingefügten *lacZ*-Leserahmens durch Umsetzung des Substrates X-Gal (Spaete et al. 1987). Die RCMV-revCD200 wurde mithilfe der Calcium-Phosphat Transfektion hergestellt. Hierbei

wurde der *lacZ*-Leserahmen entfernt und durch das Fragment Hind J des RCMV, welches das Gen vCD200 beinhaltet, ersetzt (s. Abb. 3).

Bei der Charakterisierung der hergestellten Revertante (RCMV-revCD200) zeigte sich nach Restriktionsverdau und Gelelektrophorese ein identisches Bandenmuster zu RCMV-wt (s. Abb. 5). Auch im Southern Blot (s. Abb. 6) und bei der Sequenzierung des Teilbereichs Hind J konnte kein Unterschied zwischen RCMV-wt und RCMV-revCD200 detektiert werden. Danach wurden Wachstumskurven aller drei Viren (RCMV-wt, RCMV-revCD200, RCMV- Δ CD200) erstellt. In den durchgeführten Wachstumskurven bestätigten alle drei Viren ihre gute und nahezu gleiche Replikationsfähigkeit *in vitro* bei hoher und niedriger MOI (s. Abb. 7 und 8). Aus ethischen Gesichtspunkten sollte davon abgesehen werden, Viren, die ihre Funktionalität *in vitro* nicht bestätigen konnten, im Tierversuch einzusetzen.

4.2 Expression von vCD200, CD200R und iNOS in Rattenembryofibroblasten und Makrophagen

Als Hypothese (s. 1.4) wurde angenommen, dass das RCMV CD200-Homolog einen immunmodulativen Effekt hat: vCD200 führt nach Bindung an CD200R auf Makrophagen zu einer verringerten iNOS-Produktion in diesen Zellen. Dies führt zu einer verringerten Stickoxid-Produktion und damit zu einer herabgesetzten Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe. Es wurden Versuche zur Expression der an diesem Vorgang beteiligten Gene vCD200 und CD200R, sowie Versuche zur Aktivierung des Enzyms iNOS in Makrophagen durchgeführt. Mithilfe der Durchflusszytometrie konnte vCD200 nach einer Infektion von Zellen mit RCMV-wt und RCMV-revCD200 auf REF gezeigt werden (s. Abb. 9). Der Nachweis des CD200-Rezeptors erfolgte ebenfalls durch Durchflusszytometrie und mithilfe eines monoklonalen Antikörpers (α -CD200R-bio, s. Abb. 10). Der CD200R konnte auf ca. 90% der PEZ und der Makrophagenzelllinie nachgewiesen werden (s. 3.2.2.1). In einer Studie die einen kommerziellen α -CD200R-Antikörper einsetzte wurde festgestellt, dass ein Großteil der peritonealen Makrophagen von Ratten den CD200-Rezeptor trägt (Meuth et al. 2008). Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss einer Stimulation der Makrophagen auf die Expression des CD200R mithilfe der Durchflusszytometrie untersucht, wobei festgestellt wurde, dass diese keinen Einfluss auf die Rezeptor-Expression hat (s. Abb. 13).

Im Anschluss wurde das in der Hypothese abgebildete Modell (s. Abb. 1) mithilfe von zwei Zelllinien untersucht, um den Aktivierungszustand der Makrophagen anhand des Enzyms

iNOS festzustellen. Dazu wurde jeweils eine REF-Kultur mit RCMV-wt, RCMV-revCD200, RCMV- Δ CD200 infiziert, nach 24 h wurde der gleiche Anteil Makrophagen zu den infizierten Zellen gegeben, und weitere 24 h später wurden Zell-Lysate hergestellt und ein Western Blot zum Nachweis des Enzyms iNOS durchgeführt. Die Eignung dieses Enzyms als Makrophagen-Aktivierungsmarker, und die Expression durch die in der Zellkultur verwendeten Makrophagen, wurde vorher in verschiedenen Versuchen überprüft (s. Abb. 11 und 12). Das Lysat der mit RCMV- Δ CD200 infizierten co-Kultur zeigte eine dezent höhere Expression von iNOS im Vergleich zu der mock-infizierten oder mit RCMV-wt und RCMV-revCD200 infizierten co-Kultur (s. Abb. 14). Zur Überprüfung ob vCD200 *in vivo* eine verringerte Aktivität myeloider Zellen bewirkt, wurden peritoneale Exsudatzellen nach intraperitonealer Infektion von Ratten *ex vivo* untersucht.

4.3 Aktivierungszustand peritonealer Makrophagen nach RCMV-Infektion

Ziel der Untersuchungen war es den Aktivierungszustand peritonealer Makrophagen nach intraperitonealer Infektion von Ratten mit RCMV-wt, RCMV- Δ CD200, RCMV-revCD200 anhand des Makrophagenaktivierungsmarkers iNOS festzustellen. Dazu wurden peritoneale Exsudatzellen (PEZ) zwei und sechs Tage nach der Infektion aus dem Peritoneum der Tiere entnommen und *ex vivo* mithilfe der Durchflusszytometrie untersucht.

Da die PEZ der Ratte nicht ausschließlich aus Makrophagen, sondern ebenfalls aus Granulozyten sowie weiteren Monozyten bestehen, wurde ein Makrophagenmarker (α -OX41-PE) eingesetzt (s. 3.4.1.1). Wie in Abb. 18 ersichtlich konnte nach Infektion mit den Viren zu keinem untersuchten Zeitpunkt ein Unterschied in der iNOS-Produktion der im Peritoneum befindlichen Makrophagen gezeigt werden. Es konnte, im Vergleich zu den Zellen die aus mock-infizierten Tieren gewonnen worden waren, eine vermehrte Expression des Enzyms in allen Makrophagen, die aus infizierten Tieren stammten, beobachtet werden. Dies war unabhängig davon, mit welchem Virus die Tiere infiziert worden waren. Eine unspezifische Bindung des verwendeten α -iNOS Alexa 488-Antikörpers (s. 3.4.1.2) ist unwahrscheinlich, da dieser bei der Etablierung der durchflusszytometrischen Messungen auch auf REF getestet wurde. REF sind nicht zur iNOS-Expression befähigt und wiesen nach der Färbung kein Signal auf.

Eine Ursache für das Ausbleiben eines Effektes der Expression von vCD200 auf die Makrophagen-Aktivierung könnte die schwere *in-vivo* Infizierbarkeit dieser Zellen sein. In

Untersuchungen von Hillebrands konnten nach einer intraperitonealen Infektion von Ratten mit RCMV-M nur wenige infizierte Makrophagen im Peritoneum gefunden werden (Hillebrands et al. 2003). Sollte dies bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Viren ebenfalls so sein, würde dies die unveränderte iNOS-Expression bei den infizierten Tieren erklären. In einer anderen Untersuchung wurde ebenfalls die geringe Empfänglichkeit peritonealer Makrophagen für die RCMV-Infektion gezeigt (Bruggemann 1985). Hier wurden peritoneale Makrophagen aus Ratten isoliert, *in vitro* mit RCMV infiziert und danach mit REF co-kultiviert, die permissiv sind für die RCMV-Infektion. Auch sieben Tage nach der Co-Kultivierung konnte kein zytopathischer Effekt bei den REF beobachtet werden. Eine weitere Studie zeigte, dass aus Ratten isolierte Monozyten, die in der Zellkultur mit RCMV infizierten REF co-kultiviert wurden, erst nach einer Aufreinigung durch Transmigration auf uninfizierten Fibroblasten zu einem zytopathischen Effekt dieser Zellen führen. Nach fünf Tagen kam es zur Ausbildung von Plaques (van der Strate et al. 2003). Bei den *in vitro*-Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls mit einer co-Kultur von Zellen gearbeitet. Für die Versuche wurden eine Makrophagenzelllinie und REF verwendet. Die REF wurden mit den oben genannten Viren infiziert, 24 h später wurde der gleiche Anteil Makrophagen zu den Zellen gegeben und weitere 24 h später wurden aus dem Zellgemisch Lysate gewonnen. So konnte im Western Blot gezeigt werden, dass das Lysat der mit RCMV- Δ CD200 infizierten co-Kultur eine dezent erhöhte iNOS-Produktion im Vergleich zu den mit den anderen Viren infizierten Zellen aufwies (s. Abb. 14). Bei diesen Versuchen wurden die Zellen mit einer hohen MOI (5) infiziert. Im Gegensatz dazu stellen die physiologischen Vorgänge im Kompartiment Peritoneum, wie z.B. die dort stattfindenden Resorptions-Vorgänge, oder auch Fehler bei der Applikation des Virus durch Injektion in das Peritoneum, eine nicht berechenbare Größen dar. Es ist trotz einer definiert applizierten Virusmenge (in der vorliegenden Arbeit 1×10^7 Viren/Tier) nicht überprüfbar wie viel Virus tatsächlich für die Infektion der Zellen nach der intraperitonealen Applikation zur Verfügung stand.

Untersuchungen in denen eine Kombination von *in vitro* und *in vivo* Versuchen verwendet wurde zeigen folgende Ergebnisse: intravenös injizierte Granulozyten und Monozyten von RCMV-M infizierten Ratten, die zuvor mit Fibroblasten co-kultiviert worden waren, führten zu einer Infektion dieser Tiere (van der Strate et al. 2003). Bei latent mit MCMV infizierten Mäusen (drei bis neun Monate nach der Infektion) konnte das MCMV-Genom in den peritonealen Makrophagen nachgewiesen werden. In 32 % der Fälle, bei denen die Makrophagen mit Maus-Fibroblasten co-kultiviert wurden, reaktivierte das Virus (Pollock 1997). Dort wurde diskutiert, inwiefern infizierte Makrophagen das Virus-Genom dauerhaft beinhalten und somit möglicherweise eine Rolle in der Ausbildung der Latenz der CMV-

Infektion spielen, was in Ergänzung zu der in dieser Arbeit postulierten Hypothese eine andere Möglichkeit der Bedeutung von Makrophagen innerhalb des viralen Infektionsgeschehens darstellt.

4.4 Einfluss der Infektion auf die iNOS-Expression in den peritonealen Makrophagen und der Milz

Zum Nachweis der Transkription des Gens vCD200 sowie der Gene CD200, CD200R und iNOS, wurden TaqMan-PCRs etabliert. Das virale Gen vCD200 konnte zwei und sechs Tage nach einer Infektion der Tiere mit RCMV-wt und RCMV-revCD200 in der Milz und den PEZ nachgewiesen werden (s. Abb. 23 B und 24 B), es wird aber auf einem geringeren Level transkribiert als der zelluläre Ligand (CD200) (s. Abb. 23 A und 24 A). Dies erklärt sich möglicherweise dadurch, dass sowohl in der Milz als auch bei den Zellen im peritonealen Exsudat nicht alle Zellen mit dem Virus infiziert worden sind, was die bereits formulierte These (s. 4.3), dass die im Peritoneum befindlichen Zellen eine geringe Suszeptibilität für die RCMV-Infektion zeigen, stützt. In einer *in-vitro* Studie konnte nur in den ersten drei Tagen nach einer Infektion von Makrophagen infektiöses Virus nachgewiesen werden, danach konnten keine viralen Proteine mehr in den Zellen detektiert werden. Es wurde diskutiert, dass es sich bei dem in den ersten drei Tagen nach Infektion nachgewiesenen Virus um das zugegebene Virus (Input-Virus) handelt, dass von den Zellen durch Phagozytose aufgenommen wurde (Engels et al. 1989).

Makrophagen stellen nur eine Teilpopulation der PEZ dar und zur Durchführung der TaqMan-PCRs wurde die Gesamt-RNA aus den PEZ extrahiert. Es bleibt somit auch die Frage, welche Zellen innerhalb des Peritoneums vCD200 tragen. Da der Anteil der Makrophagen in den PEZ aber bei ca. 90 % liegt, scheint eine Transkription des vCD200 innerhalb dieser Zellen wahrscheinlich. In einer Studie zur Lokalisation von Lymphozyten-Populationen konnte allerdings lediglich ein Anteil von 70 % Makrophagen innerhalb den peritonealen Exsudatzellen festgestellt werden (Barclay 1981). Eine Möglichkeit weiteren Aufschluss darüber zu erlangen wie hoch der Anteil der vCD200-exprimierenden Makrophagen innerhalb der PEZ nach einer Infektion mit RCMV-wt und RCMV-revCD200 ist, wäre eine Sortierung der PEZ vor Extraktion der RNA aus den Makrophagen.

Zum Nachweis von Virus-DNA wurde das Glykoprotein B-Gen, ein Virushüllprotein, in der Milz bestimmt, und bei allen Virus-infizierten Tieren konnte eine nahezu gleiche Expression dieses Gens nachgewiesen werden (s. Abb. 22). Ein direkter Virus-Nachweis in der Milz und

Leber erfolgte mithilfe der Virustitration. Zwei Tage nach der Infektion mit den drei Viren konnte in beiden Organen Virus detektiert werden (s. Tab. 19).

In der Milz und den PEZ wurde außerdem bei infizierten und mock-infizierten Ratten die Transkription der zellulären Gene CD200, CD200R und iNOS untersucht. Für das CD200 konnte gezeigt werden, dass die Transkription dieses Gens keiner Beeinflussung durch eine Infektion mit RCMV unterliegt (Abb. 23 A und 24 A). Eine Infektion mit den Viren zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf die Transkription des CD200R in der Milz und den PEZ (Abb. 23 D und 24 D). In einer Untersuchung aus dem Jahr 2006 konnte gezeigt werden, dass CD200R auf weit mehr Zelltypen exprimiert wird als ursprünglich angenommen. So konnte er nicht nur auf Zellen der myeloiden Reihe, sondern auch auf T- und B-Lymphozyten, und zwar auf unterschiedlichen Subpopulationen sowohl beim Menschen als auch der Maus gefunden werden (Rijkers et al. 2008; Jenmalm, Cherwinski et al. 2006). Interessant wäre eine mögliche Interaktion von vCD200 und CD200R und deren Folgen auch auf diesen Zellen zu untersuchen.

Der Nachweis der iNOS-Transkription in der TaqMan-PCR (Abb. 23 C und 24 C) bestätigte die Ergebnisse der Durchflusszytometrie (s. Abb. 18). Die Infektion mit RCMV- Δ CD200 führte nicht zu erhöhten Messwerten für iNOS in den Makrophagen. Bei Untersuchungen zum M141R, dem viralen CD200-Homolog des Myxoma-Virus, wurde drei Tage nach Infektion mit einer M141R-Deletionsmutante (Δ M141R) eine Erhöhung der iNOS-Expression in den poplitealen Lymphknoten der Tiere gefunden. Sieben Tage nach Infektion mit Δ M141R konnte eine ebenfalls gesteigerte Expression von iNOS in der Primärläsion, der Milz und den inguinalen, sowie poplitealen Lymphknoten bei den Tieren nachgewiesen werden (Cameron et al. 2005). Die Transkriptions-Analysen der vorliegenden Arbeit haben ergeben, dass zwei und sechs Tage nach Infektion mit RCMV- Δ CD200 in den PEZ und der Milz keine gesteigerte iNOS-Produktion feststellbar ist (Abb. 23 C und 24 C). Für weitere Untersuchungen zum RCMV CD200 könnte die iNOS-Expression zu anderen Zeitpunkten und in anderen Geweben (wie z.B. die poplitealen Lymphknoten) untersucht werden. In einer *in vitro*-Studie zur Untersuchung des M141-Proteins, wurde eine Hochregulierung der iNOS- und TNF- α Aktivität bei Infektion von murinen myeloiden Zellen mit Δ M141R gefunden (Zhang et al. 2009). Die Etablierung einer weiteren TaqMan-PCR zum Nachweis der Transkription von TNF- α könnte somit eine Möglichkeit darstellen, mehr Erkenntnisse zur Funktion des RCMV CD200 zu gewinnen. In *in vitro*-Studien zum K14-Protein, dem viralen CD200-Homolog des HHV-8, konnte gezeigt werden, dass nach einer Stimulation von humanen Makrophagen mit IFN- γ und LPS, CHO (chinese hamster ovary cells), die das K-14-Protein exprimierten, bei einer co-Kultivierung mit Makrophagen eine verringerte TNF- α

Sekretion zu lediglich mit dem Leervektor transfizierten Zellen zeigten (Foster-Cuevas et al. 2004). Ob diese Ergebnisse auch *in vivo* ohne eine artifizielle Stimulierung der entsprechenden Effektor-Zellen und eine Überexpression von Liganden durch die Transfektion erzielt werden können, könnte im RCMV-Modell untersucht werden.

4.5 Bedeutung der MHC-Klasse-II-Expression in der Milz

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Überprüfung des Aktivierungszustandes von Makrophagen in der Milz immunhistochemische iNOS-Färbungen dieses Organs bei infizierten und mock-infizierten Ratten durchgeführt. Ein immunhistochemischer Nachweis von MHC-Klasse-II-Molekülen wurde ebenfalls durchgeführt, und diente als Kontrollfärbung, da es sich bei diesen um konstitutiv exprimierte Moleküle handelt.

In der Hypothese (s. 1.4) wurde angenommen, dass die Zelloberflächen-Expression von vCD200 bei einer Infektion mit RCMV-wt oder RCMV-revCD200 einen immunmodulatorischen Effekt zur Folge hat, der zu einer verringerten Makrophagen-Aktivierung führt. Demzufolge müsste bei Tieren, die mit RCMV- Δ CD200 infiziert worden sind, eine vergleichsweise stärkere Aktivierung (gemessen an der Expression von iNOS) der Makrophagen erfolgen. Die bisher beschriebenen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten nicht auf einen solchen Effekt hin (s. 4.3 und 4.4.). Auch die immunhistochemischen Färbungen ergaben, dass bei den Tieren, die mit RCMV- Δ CD200 infiziert worden waren, 48 h nach der Infektion keine erhöhte iNOS-Expression in der Milz festgestellt werden kann, im Vergleich zu mock-infizierten und mit RCMV-wt oder RCMV-revCD200 infizierten Tieren (s. Abb. 25).

Ein überraschendes Ergebnis zeigt sich bei der durchgeführten Kontrollfärbung von MHC-Klasse-II-Molekülen. MHC-Klasse-II-Moleküle sind konstitutiv exprimierte Glykoproteine auf Antigen-präsentierenden Zellen, die Peptide aus Proteinen, die von außen per Phagozytose in die Zelle aufgenommen und dann in Lysosomen verdaut werden, gegenüber CD4+ T-Zellen präsentieren. Das führt zu einer verstärkten Immunantwort nach Eindringen eines Pathogens in den Organismus und somit kommt den MHC-Klasse-II-Moleküle im Rahmen der Immunabwehr eine wichtige Rolle zu. Man findet MHC-Klasse-II-Moleküle auf diversen Antigen-präsentierenden Zellen, wie B-Lymphozyten und Makrophagen (Janeway 2002). Hat also ein Virus ein Gen internalisiert, welches die Antigen-Präsentation gegenüber CD4+ T-Zellen unterdrückt, bietet dies dem Virus einen Schutz vor dem Immunsystem des Wirtes und stellt somit einen Vorteil für das Virus dar. Die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen war in der Milz von Tieren die 48 h mit RCMV- Δ CD200 infiziert waren, im Vergleich zur

Expression des Moleküls bei den Tieren, die mit den anderen Viren (RCMV-wt und RCMV-revCD200) infiziert worden sind oder mock-infiziert waren, erhöht (s. Abb. 26).

Für MCMV ist bekannt, dass eine Induktion von IL-10 durch die Infektion zu einer frühen Reduktion der Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen auf der Oberfläche von Makrophagen *in vitro* und *in vivo* führt (Redpath et al. 1999). Die CD4⁺ T-Zell spezifische Immunantwort auf eine MCMV-Infektion ist bereits untersucht worden. Diese Zellen akkumulieren nach der MCMV-Infektion in der Milz und Lunge der infizierten Tiere, produzieren dort eine Reihe von Zytokinen (IFN- γ , TNF, IL-2, IL-10, IL-17) und spielen bei der Regulierung der Pathogenese der CMV-Infektion eine wichtige Rolle (Arens et al. 2008). Im HCMV-Genom sind bereits Proteine identifiziert worden, die zu einem proteolytischen Abbau der MHC-Klasse-II-Moleküle führen (US2) oder mit der von diesen Glykoproteinen durchgeführten Antigenpräsentation interferieren und somit auf diesem Weg die Immunantwort des Organismus auf die HCMV-Infektion beeinflussen (US3 und US10) (Alcami et al. 2002).

Daten zur CD4⁺ T-Zellantwort bei einer RCMV-E Infektion sind bisher nicht bekannt. Möglicherweise handelt es sich bei dem RCMV CD200-Homolog um ein Gen, das die MHC-II-Molekül Expression in der Milz zu einem frühen Zeitpunkt, ca. zwei Tage nach Infektion, beeinflusst. Eine Möglichkeit zur Differenzierung dieser Ergebnisse wäre die Etablierung quantitativer Analyseverfahren wie eine TaqMan-PCR zum Nachweis der Transkription von MHC-Klasse-II-Molekülen.

Ein Mechanismus der temporären Herabregulierung von MHC-Klasse-I-Molekülen bei REF 12 h nach Infektion mit RCMV-M wurde bereits untersucht (Hassink et al. 2005). Die Herunterregulierung von MHC-Klasse-II-Molekülen nach Infektion mit RCMV-M wurde in einer Studie von Baca Jones et al. 2009 beschrieben. Bei Zellen, die aus dem Knochenmark von Ratten isoliert und zu dendritischen Zellen stimuliert wurden, wurde 24-48 h nach RCMV-M Infektion eine Degradation von MHC-Klasse-II-Molekülen festgestellt. Der Zeitpunkt der Degradation lässt darauf schließen, dass es sich bei dem regulierenden Gen um ein sehr früh bis früh exprimiertes Gen handelt. Der Mechanismus der Regulierung ist noch nicht bekannt, eine Zugabe von Bafilomycin, einem lysosomalen Inhibitor, führt jedoch zu einer Inhibierung der Degradation, was eine RCMV-M medierte Herabregulierung von MHC-Klasse-II-Molekülen durch endozytotische Degradation nahelegt (Baca Jones et al. 2009). Bei RCMV-M wurde bislang kein CD200-Homolog identifiziert (Voigt et al. 2005).

4.6 Überprüfung der Eingangs gestellten Hypothese und Ausblick

Wie in der Hypothese (s. 1.4) dargestellt, sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von vCD200 auf die Aktivierung von Makrophagen untersucht werden. Dabei wurde angenommen, dass es durch Expression des vCD200-Liganden (nach Infektion mit RCMV-wt und RCMV-revCD200) und Bindung des Liganden an den CD200-Rezeptor auf Makrophagen, zu einer Inhibierung der iNOS-Synthese in Makrophagen kommt. Dies führt zu einer verminderten Stickoxid-Produktion der Makrophagen und zu einer verringerten Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe, also einer Unterdrückung der Entzündungsantwort auf das Virus im Wirtsorganismus (s. Abb. 1).

In der vorliegenden Arbeit konnte aber vielmehr gezeigt werden, dass die iNOS-Expression bei aus Ratten isolierten Makrophagen unbeeinflusst davon ist, ob die Tiere mit RCMV-wt, RCMV- Δ CD200 oder RCMV-revCD200 infiziert worden sind. Ein Effekt durch die Infektion mit den Viren auf diese Zellen konnte in der Durchflusszytometrie beobachtet werden: die Ergebnis dort zeigen, dass eine Infektion der Ratten, im Vergleich zu den mock-infizierten Tieren, zu einer verstärkten iNOS-Produktion in den Makrophagen führt (s. Abb. 18). Die Untersuchung des iNOS-Transkriptionslevels in TaqMan-Untersuchungen der Organe PEZ und Milz bestätigen ein solches Ergebnis nicht (s. Abb. 23 C und 24 C). Das gleiche gilt für die immunhistochemische iNOS Färbung (s. Abb. 25). Im Rahmen der immunhistochemischen Färbungen von Milzschnitten konnte eine andere, unerwartete Beobachtung gemacht werden. Die Milzschnitte von Tieren, die mit RCMV- Δ CD200 infiziert worden sind, zeigten eine vermehrte Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen im Vergleich zu den Milzschnitten von Tieren, die mit RCMV-wt Wildtyp-Virus und RCMV-revCD200 infiziert worden sind und den mock-infizierten Tieren (s. Abb. 26). Diese Ergebnisse könnten durch quantitative Untersuchungsverfahren in weiteren Studien verifiziert werden.

Ein andere Möglichkeit Aufschluss über die Aktivierung von Makrophagen zu erlangen, wäre die Untersuchung weiterer Aktivierungsmarker. Aktivierte Makrophagen produzieren nicht nur iNOS, sondern sezernieren auch verschiedene Chemo- und Zytokine. So konnte bei der Durchführung eines Cytokin-Assays zur Funktion des HHV 8 CD200-Homologes *in vitro* neben der bereits erwähnten Inhibierung der TNF- α Expression, auch eine Herabregulierung der MCP-1 (Monozyten-chemotaktisches Protein) Produktion gezeigt werden (Foster-Cuevas et al. 2004). Dieses Protein bewirkt die Rekrutierung von Monozyten in ein entzündetes Gebiet und verstärkt somit die Immunantwort des Körpers auf eine Infektion.

Weitere Studien zum besseren Verständnis der CD200/CD200R-Interaktion scheinen auch deshalb sinnvoll, weil der mögliche therapeutische Nutzen des CD200-Moleküls und die Blockierung der Bindung an CD200R in verschiedenen Studien beschrieben wird. So konnte in einer Untersuchung zur Behandlung von durch Herpes simplex verursachten Augeninfektionen, durch die systemische Gabe eines CD200-Fusionsproteins bei Mäusen eine Besserung der Symptome beobachtet werden (Sarangi et al. 2008). Darüber hinaus wurde berichtet, dass eine Therapie mit CD200-Antikörpern gegen CD200-exprimierende Tumoren einen möglicher therapeutischer Nutzen im Rahmen einer Tumorbehandlung haben könnte, was ebenfalls die potentielle therapeutische Bedeutung des CD200-Gens deutlich macht (Kretz-Rommel et al. 2007). RCMV bietet mit der Ratte als *in vitro*-Modell die Möglichkeit mehr über die Bedeutung und Funktion des CD200-Gens bei Menschen und Tieren zu erfahren.

5 Zusammenfassung

Molekulare Untersuchung des Ratten-Cytomegalovirus (RCMV) CD200-Homologs

In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine molekulare Analyse des RCMV CD200-Homologes (vCD200). Die Entdeckung und Charakterisierung viraler Homologe zu zellulären Genen ist sowohl aus humanmedizinischer als auch veterinärmedizinischer Sicht ein wichtiger Aspekt der virologischen Forschung. Dies trifft insbesondere dann zu, wenn virale Proteine immunmodulatorische Eigenschaften besitzen. Die Beschreibung gerade solcher Mechanismen verbessert das Verständnis der Virus-Wirt-Interaktion und stellt eine Grundlage für die Entwicklung neuer antiviraler Substanzen dar. Voraussetzung solcher Untersuchungen *in vivo* ist das Vorhandensein eines Modellsystems, wozu in der vorliegenden Arbeit das RCMV genutzt wurde, sowie eine Vielzahl virologischer und immunologischer Werkzeuge für eine umfangreiche Genanalyse.

Das RCMV CD200-Homolog (vCD200) bindet an einen inhibitorischen Rezeptor (CD200R), der auf Makrophagen exprimiert wird. Bereits untersuchte virale CD200-Homologe führten zur Formulierung einer Hypothese: nach Infektion von Zellen mit RCMV führt die Bindung des vCD200 an den CD200R zu einer verminderten Aktivierung von Makrophagen und damit zu einer geringeren Produktion des Enzyms iNOS innerhalb dieser Zellen. Dies resultiert in einer verminderten NO-Ausschüttung durch die Makrophagen, und somit einer verringerten Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe. Infolgedessen wird die Replikation der Viren durch verminderte inflammatorische Stimuli im Gewebe erleichtert.

Im ersten Teil der Arbeit wurde eine RCMV CD200-Revertante (RCMV-revCD200) zur bereits bestehenden RCMV CD200-Deletionsmutante (RCMV- Δ CD200) des RCMV-E Wildtyp-Virus (RCMV-wt) hergestellt. Diese wurde *in vitro* charakterisiert und wies die gleichen Eigenschaften wie RCMV-wt auf. Alle drei Viren zeigten auf Rattenembryofibroblasten (REF) vergleichbare Wachstumseigenschaften.

Im Anschluss wurden Lysate einer REF/Makrophagen co-Kultur mithilfe des Western Blot untersucht. Dazu wurden zunächst REF mit den Viren RCMV-wt, RCMV-revCD200 und RCMV- Δ CD200 infiziert, und 24 h später die gleiche Anzahl Makrophagen zu den infizierten REF gegeben. Weitere 24 h später wurden die Lysate aus dem Zellgemisch gewonnen. Das Lysat der co-Kultur, die mit RCMV- Δ CD200 infiziert worden war, zeigte, entsprechend der Hypothese, eine dezent höhere iNOS-Expression im Vergleich zu den anderen Lysaten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Methoden (TaqMan-PCR und Durchflusszytometrie) zum Nachweis und zur Quantifizierung der Gene CD200, vCD200, CD200R und iNOS etabliert. Es wurde Gewebematerial (peritoneale Exsudatzellen und Milz) aus Ratten, die mit den Viren RCMV-wt, RCMV-revCD200 und RCMV- Δ CD200 infiziert worden waren, *ex vivo* untersucht.

Entgegen der in der Hypothese formulierten Annahme zeigten die peritonealen Exsudatzellen von Tieren, die mit RCMV-wt oder RCMV-revCD200 infiziert worden waren, im Vergleich zu den Zellen von Tieren, die mit RCMV- Δ CD200 infiziert worden waren, keine verringerte iNOS-Produktion. Das gleiche gilt auch für die Untersuchungen der Milz der Tiere. Eine Transkription der Gene vCD200, CD200 und CD200R konnte in den untersuchten Geweben nachgewiesen werden. Durch Quantifizierung des Virushüllproteins Glykoprotein B konnte eine vergleichbare Viruslast aller infizierten Tiere zwei und sechs Tage nach Infektion gezeigt werden. Mithilfe der Virustitration konnte zwei Tage nach Infektion Virus in der Milz und Leber infizierter Tiere nachgewiesen werden.

Einen überraschenden Befund stellte die im Rahmen einer immunhistochemischen Färbung durchgeführte Betrachtung der Expression der MHC-Klasse-II-Moleküle in der Milz der Tiere dar. Die Milz-Schnitte zeigten, dass alle mit RCMV- Δ CD200 infizierten Tiere eine deutlich stärkere Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen aufwiesen, als mock-infizierte oder mit RCMV-wt und RCMV-revCD200 infizierte Tiere.

6 Summary

Molecular analysis of the rat cytomegalovirus (RCMV) CD200-homologue

The aim of the presented work was to accomplish a functional analysis of the RCMV CD200-homologue (vCD200). The better understanding of viral homologues leads to a better understanding of the virus-host-interactions which opens new possibilities to develop efficient drugs. The premise for an *in-vivo* analysis is the existence of an animal model which is given here by RCMV.

vCD200 binds to an inhibitory receptor (CD200R) that is mainly expressed on myeloid cells, e.g. macrophages. Myeloid cells can be regulated through cell-cell interactions that are triggered by matched sets of activating or inhibitory receptors. The results of other studies that proved an inhibitory role for other, already better known, viral CD200-homologues lead to forming a hypothesis about the function of the RCMV CD200-homologue: The interaction between vCD200 and the CD200R leads to an inhibitory effect within the macrophage resulting in less production of the enzyme iNOS. This means less generation of NO in the surrounding tissues finally resulting in less inflammation. Gaining a gene that mediates a function like that is of huge benefit for the virus because less inflammation in tissues surrounded by virus infected cells means easier replication for the virus within its host.

In the first part of the presented work a recombinant virus (RCMV-revCD200) of the already existing RCMV CD200 deletion mutant (RCMV- Δ CD200) was produced via co-transfection and tested *in vitro*. RCMV-revCD200 and RCMV- Δ CD200 were compared with the RCMV wildtype virus (RCMV-wt) and it was shown that all three viruses had the same replication-abilities *in vitro*.

Afterwards a cell co-culture of macrophages and fibroblastic cells were infected with the three viruses (RCMV-wt, RCMV-revCD200, RCMV- Δ CD200) and iNOS expression was investigated in western blot. According to the hypothesis, the cells of the co-culture that was infected with RCMV- Δ CD200 showed a slightly higher expression of iNOS.

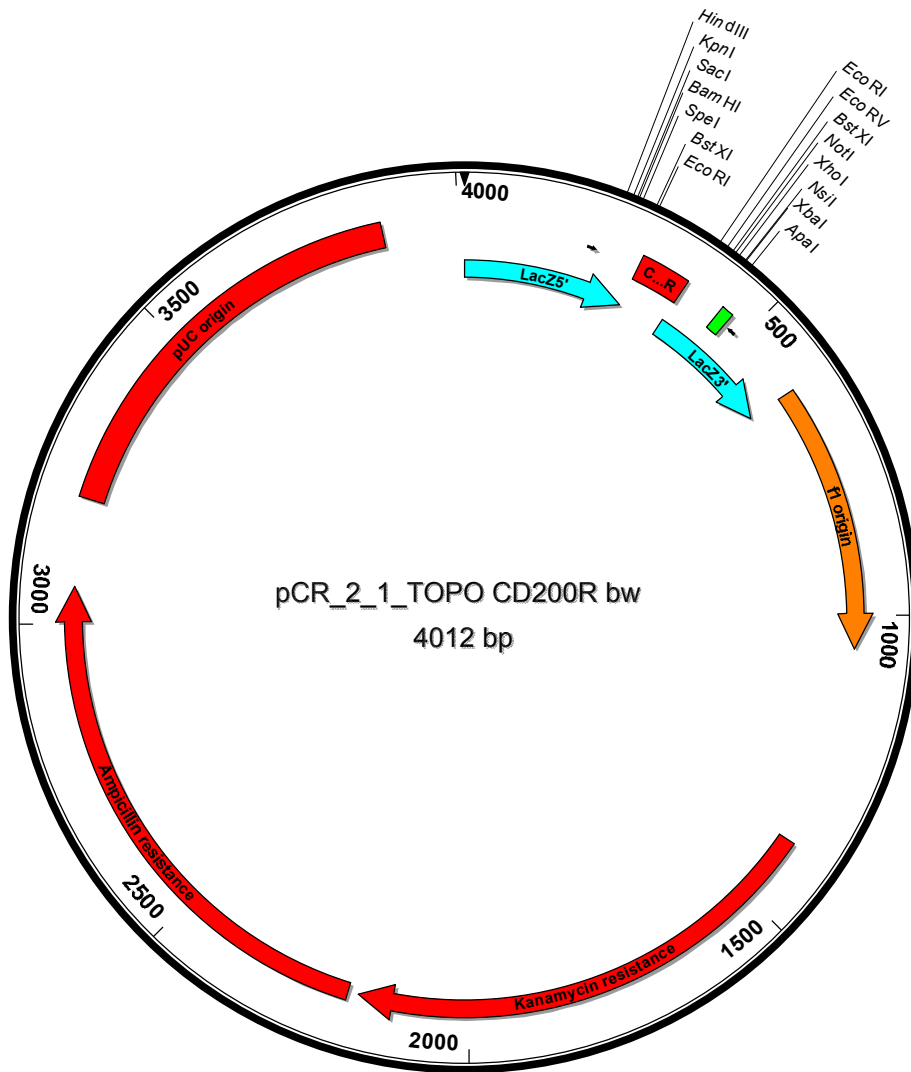
In the second part of the presented work tissues from animals infected with RCMV-wt, RCMV-revCD200, RCMV- Δ CD200 were investigated with methods that allow a quantification of the results found in the *in vitro* studies. To accomplish this quantitative experiments were established such as fluorescence activated cell sorting (FACS) and TaqMan-PCR.

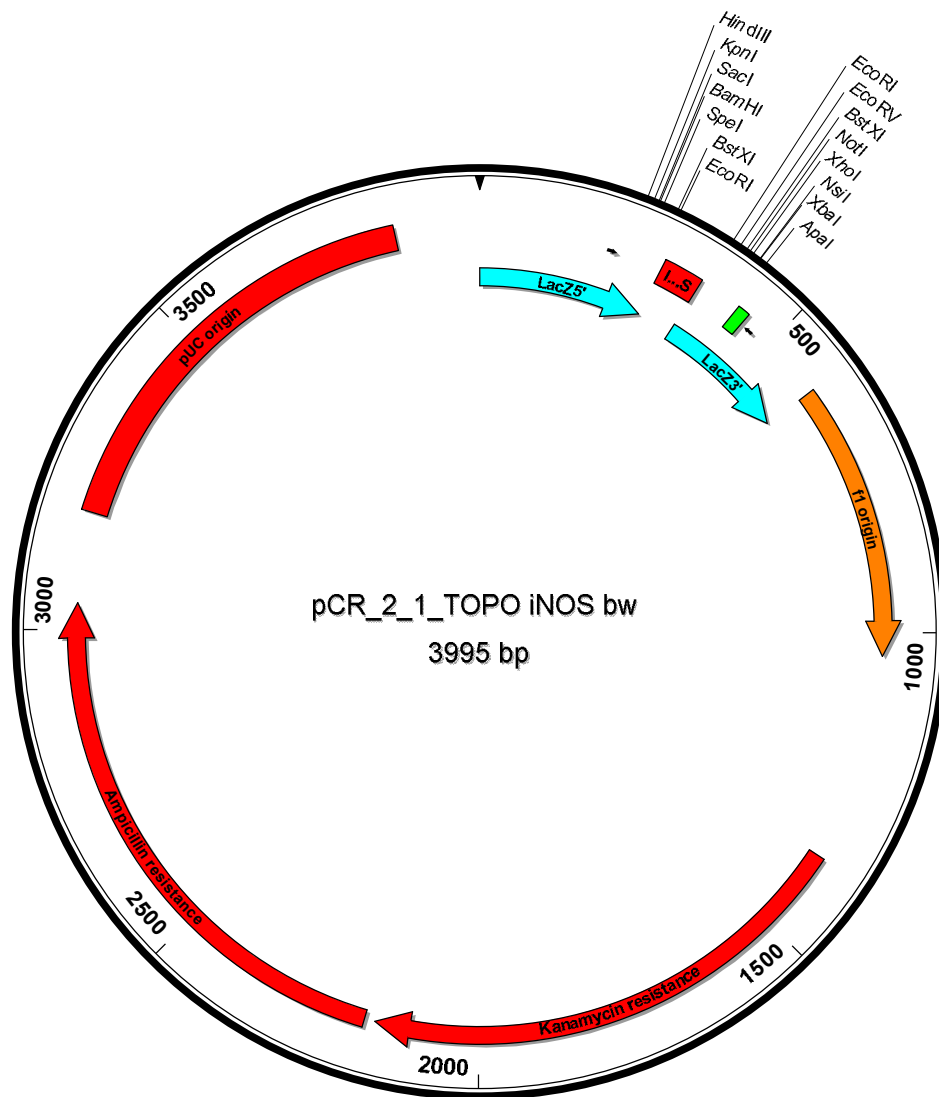
Macrophages gained from the peritoneum of the animals were examined for iNOS-production in FACS and TaqMan-PCR. Additionally the expression of the genes vCD200, CD200, CD200R and iNOS were analysed in the peritoneal cells as well as in the spleen of the animals. A result of lower expression of iNOS in the macrophages of those animals infected with RCMV-wt or RCMV-revCD200 in comparison with RCMV- Δ CD200 could not be found in the presented work. The transcription of the genes playing a role in the inhibition of the macrophages: vCD200, CD200 and CD200R could be detected in the investigated tissues of the animals. All animals got tested for expression of gB and it could be shown that all animals that were infected with the viruses were equally positive for gB expression. Virus was detected with plaque assay in both liver and spleen of infected animals two days after infection.

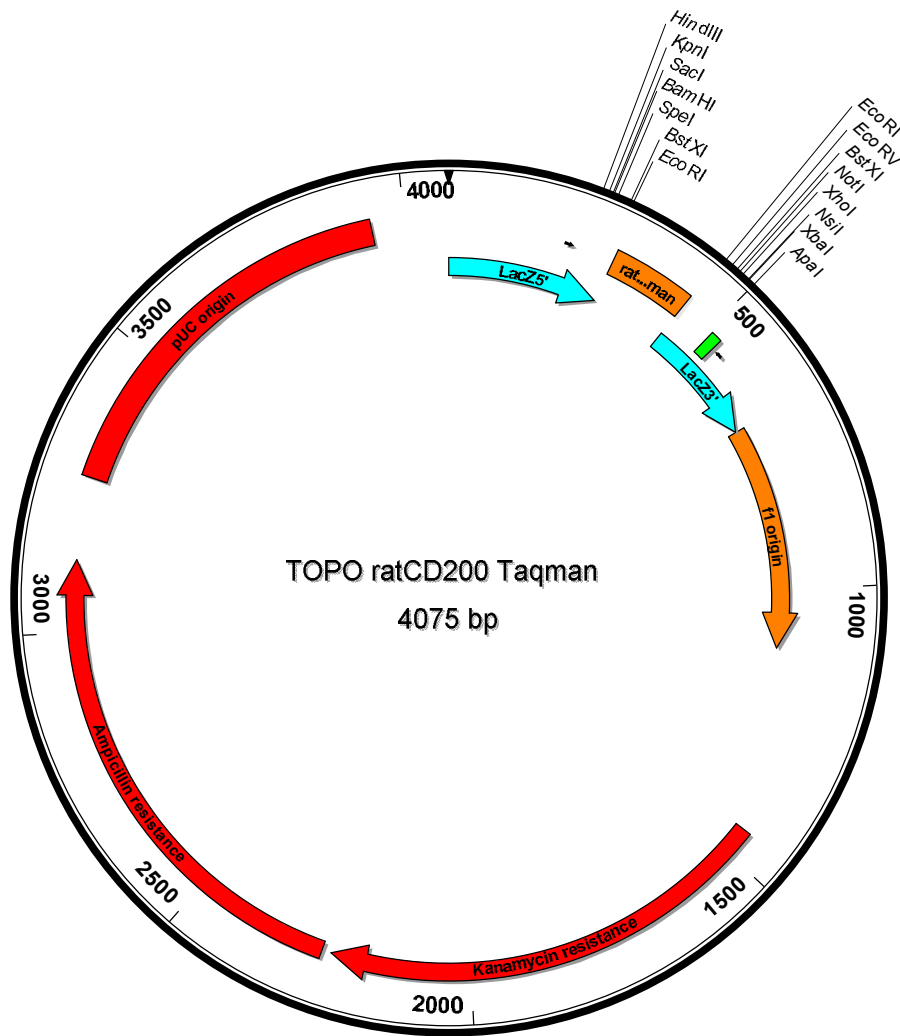
A surprising finding could be obtained in an immune histochemical staining of the spleens for the MHC-class-II-molecule. This glycoprotein plays an important role within the antigen presentation of body-foreign peptide fragments towards CD4⁺ T-cells. These cells then activate other cells of the immune systems which can lead to an elimination of the pathogen. In the spleens of uninfected animals or those animals infected with the RCMV-wt or RCMV-revCD200 compared to those animals infected with RCMV- Δ CD200 showed less expression of MCH class-II molecules.

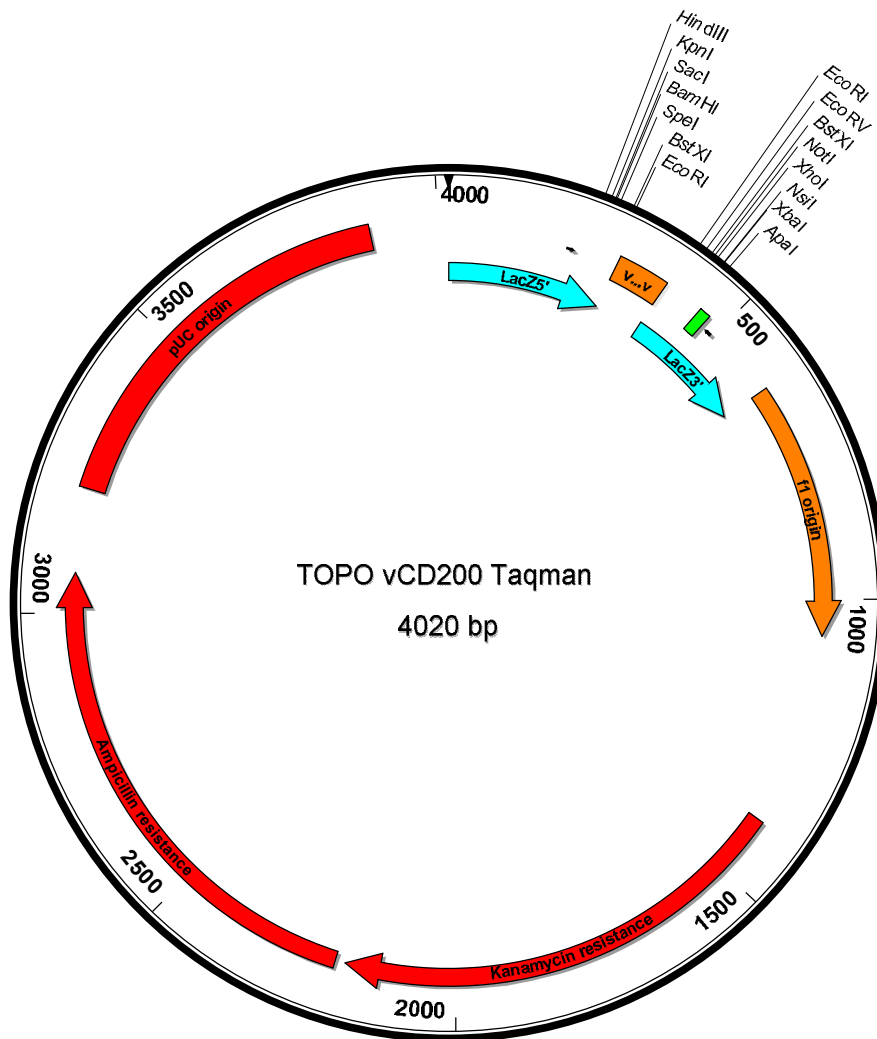
III. Anhang

7 Vektorkarten





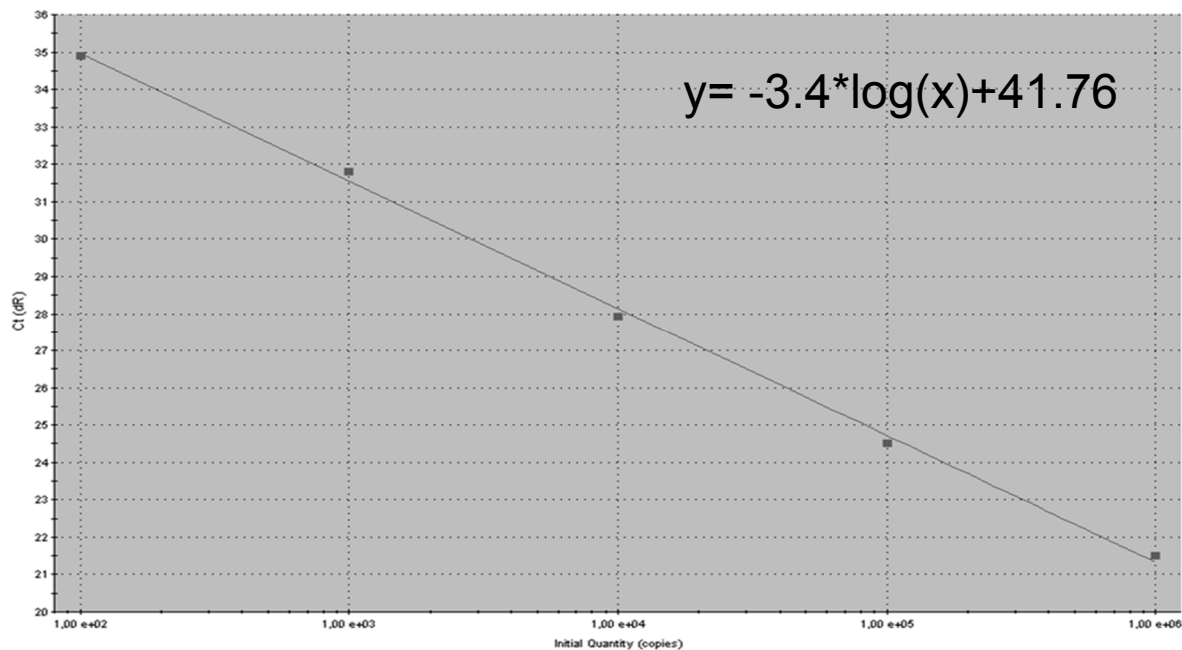




8 Standardgeraden und Rohdaten

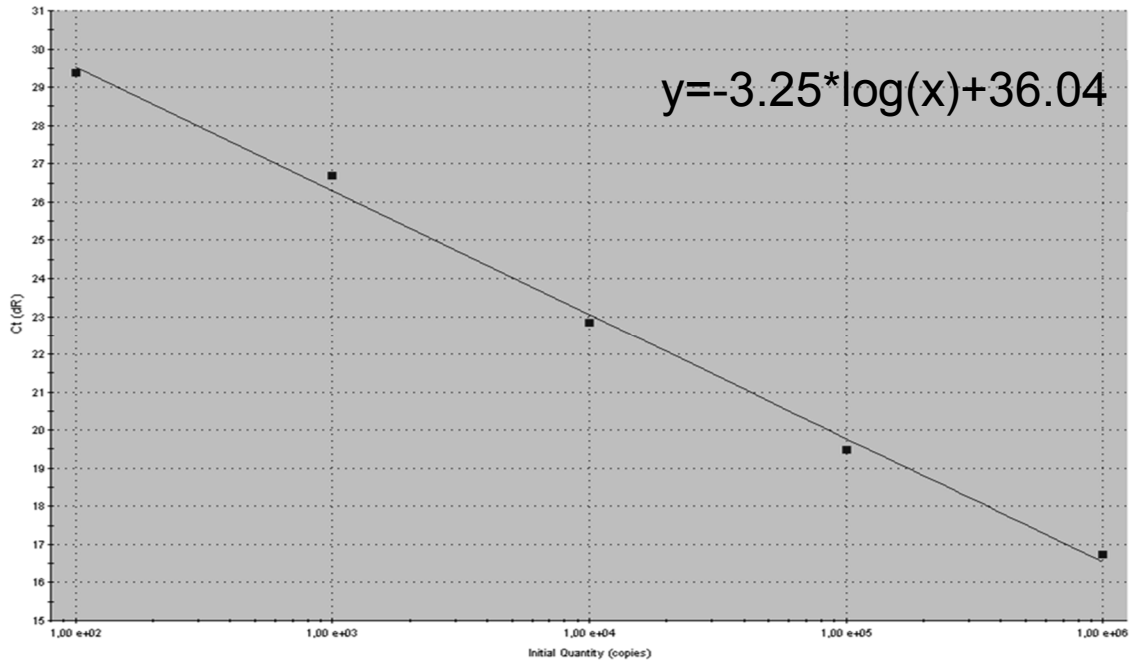
Dargestellt sind die im Rahmen der Arbeit etablierten Standardgeraden, auf der Ordinate sind die gemessenen ct-Werte aufgetragen, die Abszisse zeigt die Zahl der Plasmid-Kopien an. Innerhalb der Abbildung ist die jeweilige Standardgeradengleichung angegeben. Die Abbildungserstellung erfolgte mithilfe der Gerätesoftware des MX Pro 4.01, Stratagene, USA. Unter der Abbildung sind die zugrundeliegenden Rohdaten in Tabellenform dargestellt. Details zur Methode TaqMan-PCR bzw. der Erstellung von Standardgeraden s. 2.2.18.

8.1 Standardgerade und Rohdaten CD200



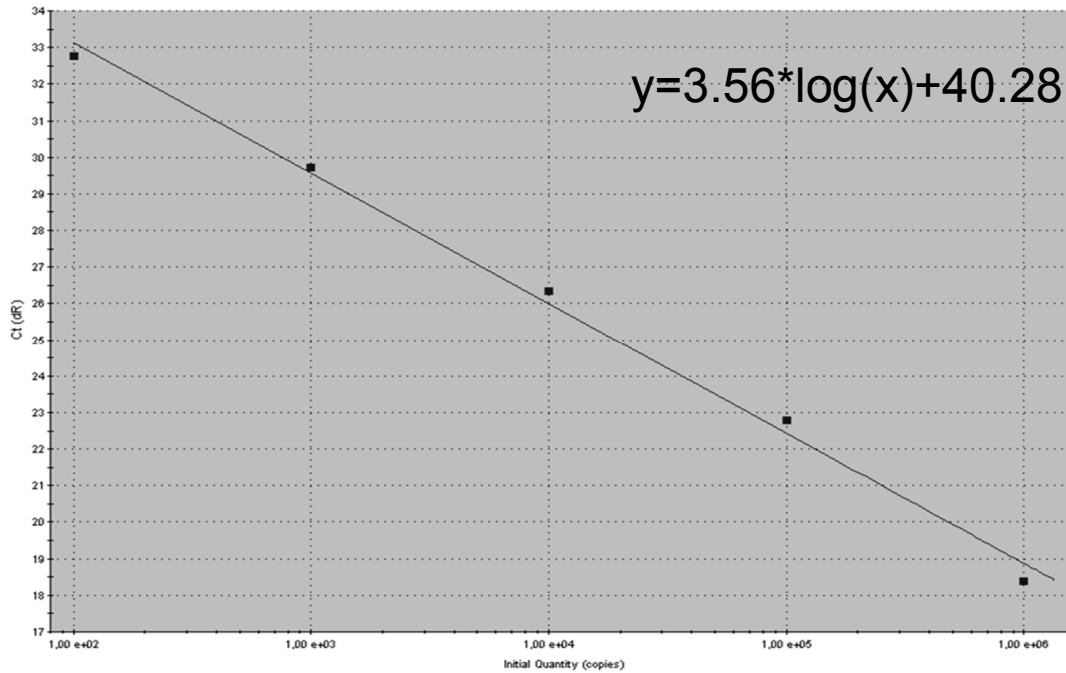
Well Name	Assay	Well Type	Replicate	Threshold(dR)	Ct (dR)	Quantity (copies)	RSq(dR)	Slope(dR)
rat10e6	HEX	Standard	8	566.500	21.14	1.00e+006	0.995	-3.399
rat10e6	HEX	Standard	8	566.500	21.94	1.00e+006	0.995	-3.399
rat10e5	HEX	Standard	9	566.500	24.57	1.00e+005	0.995	-3.399
rat10e5	HEX	Standard	9	566.500	24.46	1.00e+005	0.995	-3.399
rat10e4	HEX	Standard	10	566.500	28.11	1.00e+004	0.995	-3.399
rat10e4	HEX	Standard	10	566.500	27.84	1.00e+004	0.995	-3.399
rat10e3	HEX	Standard	11	566.500	32.18	1.00e+003	0.995	-3.399
rat10e3	HEX	Standard	11	566.500	31.33	1.00e+003	0.995	-3.399
rat10e2	HEX	Standard	12	566.500	34.98	1.00e+002	0.995	-3.399
rat10e2	HEX	Standard	12	566.500	34.84	1.00e+002	0.995	-3.399

8.2 Standardgerade und Rohdaten vCD200



Well Name	Well Type	Replicate	Threshold (dR)	Ct (dR)	Quantity (copies)	RSq (dR)	Slope (dR)
v10e6	Standard	1	734.620	16.51	1.00e+006	0.994	-3.254
v10e6	Standard	1	734.620	16.98	1.00e+006	0.994	-3.254
v10e5	Standard	2	734.620	19.26	1.00e+005	0.994	-3.254
v10e5	Standard	2	734.620	19.74	1.00e+005	0.994	-3.254
v10e4	Standard	3	734.620	22.80	1.00e+004	0.994	-3.254
v10e4	Standard	3	734.620	22.90	1.00e+004	0.994	-3.254
v10e3	Standard	4	734.620	26.41	1.00e+003	0.994	-3.254
v10e3	Standard	4	734.620	27.11	1.00e+003	0.994	-3.254
v10e2	Standard	5	734.620	29.33	1.00e+002	0.994	-3.254
v10e2	Standard	5	734.620	29.44	1.00e+002	0.994	-3.254

8.3 Standardgerade und Rohdaten CD200R



Assay	Well Type	Replicate	Threshold (dR)	Ct (dR)	Quantity (copies)	RSq (dR)	Slope (dR)
FAM	Standard	2	1.746.683	18.40	1.00e+006	0.995	-3.568
FAM	Standard	2	1.746.683	18.41	1.00e+006	0.995	-3.568
FAM	Standard	3	1.746.683	22.65	1.00e+005	0.995	-3.568
FAM	Standard	3	1.746.683	22.88	1.00e+005	0.995	-3.568
FAM	Standard	4	1.746.683	26.40	1.00e+004	0.995	-3.568
FAM	Standard	4	1.746.683	26.32	1.00e+004	0.995	-3.568
FAM	Standard	5	1.746.683	29.88	1.00e+003	0.995	-3.568
FAM	Standard	5	1.746.683	29.57	1.00e+003	0.995	-3.568
FAM	Standard	6	1.746.683	32.66	1.00e+002	0.995	-3.568
FAM	Standard	6	1.746.683	32.87	1.00e+002	0.995	-3.568

8.4 Rohdaten iNOS

Die Standardgerade für das Gen iNOS ist in Abb. 19 dargestellt.

Well Name	Well Type	Replicate	Threshold (dR)	Ct (dR)	Quantity (copies)	RSq (dR)	Slope (dR)
iNos 1e6	Standard	1	2.489.605	22.20	1.00e+006	0.998	-3.367
iNos 1e6	Standard	1	2.489.605	22.11	1.00e+006	0.998	-3.367
iNos 1e5	Standard	2	2.489.605	25.48	1.00e+005	0.998	-3.367
iNos 1e5	Standard	2	2.489.605	25.53	1.00e+005	0.998	-3.367
iNos 1e4	Standard	3	2.489.605	28.97	1.00e+004	0.998	-3.367
iNos 1e4	Standard	3	2.489.605	28.98	1.00e+004	0.998	-3.367
iNos 1e3	Standard	4	2.489.605	32.38	1.00e+003	0.998	-3.367
iNos 1e3	Standard	4	2.489.605	32.00	1.00e+003	0.998	-3.367
iNos 1e2	Standard	5	2.489.605	35.27	1.00e+002	0.998	-3.367
iNos 1e2	Standard	5	2.489.605	36.03	1.00e+002	0.998	-3.367

8.5 Rohdaten TaqMan-PCR Makrophagen

Die folgenden Rohdaten stellen die Grundlage der in Abb. 24 gezeigten Ergebnisse dar. Die Übertragung der Daten in eine EXCEL-Datei erfolgte mithilfe des geräteinternen Softwareprogrammes. Im Anschluss an die jeweiligen Rohdaten wird die Berechnung die der Abb. 24 zugrunde liegt angefügt. Für Erläuterungen zur Durchführung der TaqMan-PCRs s. 2.2.18.

8.5.1 RohdatenTaqMan-PCR iNOS

Well Name	Threshold	Ct (dR)	Quantity (copies)	Quantity Avg. (copies)	-RT bereinigt	iNOS/cmhc	log iNOS/cmhc
SD1_MO_iNOS+RT	1028,313	29,73	4,62E+03	1,10E+03	1,10E+03	3,531	0,548
		29,23					
SD2_MO_iNOS+RT	1028,313	29,76	4,26E+03	7,25E+02	7,25E+02	16,210	1,210
		29,41					
SD3_MO_iNOS+RT	1028,313	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD4_MO_iNOS+RT	1028,313	32,43	5,96E+02	2,11E+01	2,11E+01	0,033	1,488
		32,50					
SD5_MO_iNOS+RT	1028,313	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD1_MO_iNOS-RT	1051,543	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD2_MO_iNOS-RT	1051,543	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					

SD3_MO_iNOS-RT	1051,543	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD4_MO_iNOS-RT	1051,543	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD5_MO_iNOS-RT	1051,543	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD6_MO_iNOS+RT	1028,313	26,42	3,63E+04	1,77E+02	1,77E+02	1,911	0,281
		26,43					
SD7_MO_iNOS+RT	1028,313	22,92	4,09E+05	2,40E+04	2,40E+04	26,004	1,415
		22,80					
SD8_MO_iNOS+RT	1028,313	32,73	4,27E+02	9,96E+01	9,96E+01	0,198	0,703
		33,22					
SD9_MO_iNOS+RT	1028,313	22,73	4,83E+05	4,90E+04	4,90E+04	384,458	2,585
		22,51					
SD10_MO_iNOS+RT	1028,313	23,83	2,15E+05	3,61E+03	3,61E+03	4,435	0,647
		23,79					
SD6_MO_iNOS-RT	1051,543	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD7_MO_iNOS-RT	1051,543	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD8_MO_iNOS-RT	1051,543	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD9_MO_iNOS-RT	1051,543	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD10_MO_iNOS-RT	1051,543	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD11_MO_iNOS+RT	1028,313	26,04	5,18E+04	6,72E+03	6,72E+03	567,709	2,754
		25,77					
SD12_MO_iNOS+RT	1028,313	23,86	1,92E+05	2,10E+04	2,10E+04	107,922	2,033
		24,09					
SD14_MO_iNOS+RT	1028,313	24,02	1,83E+05	5,03E+03	5,03E+03	15,723	1,197
		24,07					
SD15_MO_iNOS+RT	1028,313	32,34	5,74E+02	1,08E+02	1,08E+02	0,186	0,730
		32,73					
SD11_MO_iNOS-RT	1051,543	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD12_MO_iNOS-RT	1051,543	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD14_MO_iNOS-RT	1051,543	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD15_MO_iNOS-RT	1051,543	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD16_MO-iNOS+RT	588,388	26,14	4,50E+04	1,54E+03	1,54E+03	1,516	0,181
		26,07					
SD17_MO-iNOS+RT	588,388	26,04	4,93E+04	3,00E+03	3,00E+03	1,606	0,206
		25,91					
SD18_MO-iNOS+RT	588,388	36,48	3,91E+01	2,73E-01	2,73E-01	0,001	3,177
		36,47					
SD19_MO-iNOS+RT	588,388	27,74	1,75E+04	3,75E+03	3,75E+03	2,515	0,401
		27,29					
SD20_MO-iNOS+RT	588,388	28,33	1,14E+04	2,03E+03	2,03E+03	1,959	0,292
		27,96					
SD16_MO_iNOS-RT	1279,906	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD17_MO_iNOS-RT	1279,906	No Ct	No Ct	No Ct			

		No Ct					
SD18_MO_iNOS-RT	1279,906	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD19_MO_iNOS-RT	1279,906	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD20_MO_iNOS-RT	1279,906	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD21_MO_iNOS+RT	588,388	33,71	3,30E+02	1,05E+02	1,05E+02	0,092	1,037
		33,04					
SD22_MO_iNOS+RT	588,388	26,78	2,98E+04	1,89E+03	1,89E+03	1,238	0,093
		26,65					
SD23_MO_iNOS+RT	588,388	28,13	1,31E+04	2,45E+03	2,45E+03	1,871	0,272
		27,74					
SD24_MO_iNOS+RT	588,388	28,37	1,09E+04	1,69E+03	1,69E+03	0,547	0,262
		28,04					
SD25_MO_iNOS+RT	588,388	30,31	3,15E+03	8,08E+02	8,08E+02	1,722	0,236
		29,77					
SD21_MO_iNOS-RT	1279,906	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD22_MO_iNOS-RT	1279,906	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD23_MO_iNOS-RT	1279,906	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD24_MO_iNOS-RT	1279,906	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD25_MO_iNOS-RT	1279,906	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD26_MO_iNOS+RT	588,388	31,37	1,10E+03	2,22E+02	2,22E+02	0,266	0,576
		31,80					
SD27_MO_iNOS+RT	588,388	28,79	7,73E+03	6,49E+02	6,49E+02	0,847	0,072
		28,61					
SD28_MO_iNOS+RT	588,388	29,94	3,20E+03	1,74E+02	1,74E+02	0,150	0,824
		30,05					
SD29_MO_iNOS+RT	588,388	28,75	7,61E+03	1,80E+02	1,80E+02	1,262	0,101
		28,70					
SD30_MO_iNOS+RT	588,388	29,43	3,77E+03	1,33E+03	1,33E+03	0,870	0,060
		30,18					
SD26_MO_iNOS-RT	1279,906	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD27_MO_iNOS-RT	1279,906	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD28_MO_iNOS-RT	1279,906	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD29_MO_iNOS-RT	1279,906	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD30_MO_iNOS-RT	1279,906	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD31_MO_iNOS+RT	588,388	31,07	1,10E+03	6,15E+02	6,15E+02	1,376	0,139
		32,30					
SD32_MO_iNOS+RT	588,388	34,18	1,19E+02	9,47E+01	9,47E+01	0,266	0,575
		36,07					
SD33_MO_iNOS+RT	588,388	33,02	2,85E+02	1,75E+02	1,75E+02	3,659	0,563
		34,39					
SD34_MO_iNOS+RT	588,388	29,53	4,50E+03	1,32E+02	1,32E+02	0,323	0,491
		29,46					

SD35_MO_iNOS+RT	588,388	30,70	1,82E+03	2,30E+02	2,30E+02	0,278	0,556
		30,96					
SD31_MO_iNOS-RT	1279,906	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD32_MO_iNOS-RT	1279,906	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD33_MO_iNOS-RT	1279,906	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD34_MO_iNOS-RT	1279,906	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD35_MO_iNOS-RT	1279,906	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					

Goup	mean value iNOS/cmyc	standard deviation	mittelwert log10 (iNOS/cmyc)	Stabwn log10 iNOS/cmyc	Stabwn log10 (iNOS/cmyc)/Wurzel(n)
SD1-SD5 mock	6,59E+00	6,95E+00	9,00E-02	1,15E+00	6,63E-01
SD6-SD10 wt d2	8,34E+01	1,51E+02	8,45E-01	1,11E+00	4,94E-01
SD11-SD15 ko d2	1,73E+02	2,32E+02	1,31E+00	1,30E+00	6,51E-01
SD16-SD20 rev d2	1,52E+00	9,35E-01	-5,70E-01	1,51E+00	6,74E-01
SD21-SD25 wt d6	1,09E+00	6,82E-01	-1,40E-01	4,87E-01	2,18E-01
SD26-SD30 ko d6	6,79E-01	4,14E-01	-2,86E-01	3,52E-01	1,57E-01
SD31-SD35 rev d6	1,18E+00	1,31E+00	-1,84E-01	4,58E-01	2,05E-01

8.5.2 Rohdaten TaqMan-PCR CD200

Well Name	Threshold (dR)	Ct (dR)	Quantity (copies)	Quantity Avg. (copies)	-RT bereinigt	ratCD200/ cmyc	log ratCD200/ cmyc
SD1_MO_CD200+RT	171,321	29,70	3,71E+02	5,51E+01	5,51E+01	0,177	0,753
		29,40					
SD2_MO_CD200+RT	171,321	31,42	1,22E+02	3,01E+01	3,01E+01	0,674	0,172
		30,91					
SD3_MO_CD200+RT	180,854	32,23	6,64E+01	1,32E+01	1,32E+01	0,043	1,369
		31,82					
SD4_MO_CD200+RT	180,854	30,91	1,15E+02	4,00E+01	4,00E+01	0,062	1,211
		31,63					
SD5_MO_CD200+RT	180,854	32,21	6,23E+01	6,19E+00	6,19E+00	0,011	1,954
		32,01					
SD1_MO_CD200-RT	171,321	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD2_MO_CD200-RT	171,321	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD3_MO_CD200-RT	260,725	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD4_MO_CD200-RT	260,725	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD5_MO_CD200-RT	260,725	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD6_MO_CD200+RT	171,321	29,94	3,48E+02	9,60E+01	9,60E+01	1,036	0,015
		29,38					
SD7_MO_CD200+RT	171,321	26,14	3,89E+03	1,15E+02	1,15E+02	0,124	0,906
		26,20					

SD8_MO_CD200+RT	180,854	31,58 31,72	8,54E+01	5,74E+00	5,74E+00	0,011	1,943
SD9_MO_CD200+RT	180,854	25,59 25,62	5,74E+03	8,25E+01	8,25E+01	0,648	0,189
SD10_MO_CD200+RT	180,854	24,83 24,79	9,96E+03	1,83E+02	1,83E+02	0,225	0,648
SD6_MO_CD200-RT	171,321	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD7_MO_CD200-RT	171,321	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD8_MO_CD200-RT	260,725	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD9_MO_CD200-RT	260,725	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD10_MO_CD200-RT	260,725	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD11_MO_CD200+RT	171,321	26,61 26,09	3,48E+03	8,80E+02	8,80E+02	74,396	1,872
SD12_MO_CD200+RT	171,321	25,83 25,43	5,69E+03	1,13E+03	1,13E+03	5,797	0,763
SD14_MO_CD200+RT	180,854	25,94 25,25	5,96E+03	1,98E+03	1,98E+03	6,182	0,791
SD15_MO_CD200+RT	180,854	30,97 30,06	1,97E+02	8,55E+01	8,55E+01	0,148	0,830
SD11_MO_CD200-RT	171,321	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD12_MO_CD200-RT	171,321	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD14_MO_CD200-RT	260,725	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD15_MO_CD200-RT	260,725	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD16_MO_CD200+RT	171,321	27,69 27,58	1,40E+03	7,69E+01	7,69E+01	0,076	1,121
SD17_MO_CD200+RT	171,321	26,06 26,18	4,01E+03	2,29E+02	2,29E+02	0,123	0,911
SD18_MO_CD200+RT	180,854	34,12 33,52	1,93E+01	5,59E+00	5,59E+00	0,014	1,865
SD19_MO_CD200+RT	180,854	29,73 29,34	3,76E+02	7,16E+01	7,16E+01	0,048	1,319
SD20_MO_CD200+RT	180,854	29,43 28,93	4,83E+02	1,17E+02	1,17E+02	0,113	0,949
SD16_MO_CD200-RT	171,321	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD17_MO_CD200-RT	171,321	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD18_MO_CD200-RT	260,725	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD19_MO_CD200-RT	260,725	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD20_MO_CD200-RT	260,725	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD21_MO_CD200+RT	171,321	29,75 30,14	2,82E+02	5,44E+01	5,44E+01	0,048	1,321
SD22_MO_CD200+RT	171,321	26,03 25,92	4,43E+03	2,42E+02	2,42E+02	0,158	0,801
SD23_MO_CD200+RT	180,854	26,74	2,96E+03	4,93E+02	4,93E+02	0,377	0,424

		26,40					
SD24_MO_CD200+RT	180,854	26,34 26,37	3,40E+03	4,53E+01	4,53E+01	0,015	1,833
SD25_MO_CD200+RT	180,854	27,64 27,33	1,56E+03	2,40E+02	2,40E+02	0,511	0,291
SD21_MO_CD200-RT	171,321	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD22_MO_CD200-RT	171,321	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD23_MO_CD200-RT	260,725	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD24_MO_CD200-RT	260,725	38,38 No Ct	7,88E-01	No Ct			
SD25_MO_CD200-RT	260,725	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD26_MO_CD200+RT	171,321	30,07 29,78	2,85E+02	4,16E+01	4,16E+01	0,050	1,303
SD27_MO_CD200+RT	171,321	27,38 27,34	1,69E+03	3,66E+01	3,66E+01	0,048	1,321
SD28_MO_CD200+RT	180,854	27,78 27,62	1,34E+03	1,09E+02	1,09E+02	0,094	1,028
SD29_MO_CD200+RT	180,854	28,56 28,90	6,57E+02	1,11E+02	1,11E+02	0,775	0,111
SD30_MO_CD200+RT	180,854	29,34 28,96	4,91E+02	9,22E+01	9,22E+01	0,060	1,221
SD26_MO_CD200-RT	171,321	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD27_MO_CD200-RT	171,321	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD28_MO_CD200-RT	260,725	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD29_MO_CD200-RT	260,725	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD30_MO_CD200-RT	260,725	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD31_MO_CD200+RT	180,854	31,29 31,70	9,61E+01	1,93E+01	1,93E+01	0,043	1,364
SD32_MO_CD200+RT	180,854	31,22 31,36	1,10E+02	7,58E+00	7,58E+00	0,021	1,671
SD33_MO_CD200+RT	180,854	31,55 31,75	8,56E+01	8,71E+00	8,71E+00	0,183	0,738
SD34_MO_CD200+RT	180,854	30,23 30,18	2,33E+02	5,99E+00	5,99E+00	0,015	1,834
SD35_MO_CD200+RT	180,854	30,55 30,36	1,97E+02	1,87E+01	1,87E+01	0,023	1,645
SD31_MO_CD200-RT	260,725	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD32_MO_CD200-RT	260,725	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD33_MO_CD200-RT	260,725	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD34_MO_CD200-RT	260,725	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD35_MO_CD200-RT	260,725	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			

Goup	mean value ratCd200/cmyc	standard deviation	mittelwert log10 (ratCd200/cmyc)	Stabwn log10 rCD200/cmyc	Stabwn log10 (rCD200/cmyc)/Wurzel(n)
SD1-SD5 mock	1,93E-01	2,47E-01	-1,09E+00	5,99E-01	2,68E-01
SD6-SD10 wt d2	4,09E-01	3,80E-01	-7,34E-01	6,87E-01	3,07E-01
SD11-SD15 ko d2	2,16E+01	3,06E+01	6,49E-01	9,64E-01	4,82E-01
SD16-SD20 rev d2	7,43E-02	4,52E-02	-1,26E+00	3,84E-01	1,92E-01
SD21-SD25 wt d6	2,22E-01	1,92E-01	-9,34E-01	5,74E-01	2,57E-01
SD26-SD30 ko d6	2,05E-01	2,85E-01	-9,97E-01	4,55E-01	2,03E-01
SD31-SD35 rev d6	5,69E-02	6,36E-02	-1,45E+00	3,87E-01	1,73E-01

8.5.3 Rohdaten TagMan-PCR vCD200

Well Name	Threshold (dR)	Ct (dR)	Quantity (copies)	Quantity Avg. (copies)	-RT bereinigt	vCD200/ cmyc	log vCD200/ cmyc
SD1_MO_vCD200+RT	1111,433	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
		No Ct					
SD2_MO_vCD200+RT	1111,433	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
		No Ct					
SD3_MO_vCD200+RT	1111,433	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
		No Ct					
SD4_MO_vCD200+RT	1111,433	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
		No Ct					
SD5_MO_vCD200+RT	1111,433	38,54	1,80E-01	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
		No Ct					
SD1_MO_vCD200-RT	1371,971	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD2_MO_vCD200-RT	1371,971	42,55	1,06E-02	No Ct			
		No Ct					
SD3_MO_vCD200-RT	1371,971	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD4_MO_vCD200-RT	1371,971	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD5_MO_vCD200-RT	1371,971	37,96	2,72E-01	No Ct			
		No Ct					
SD6_MO_vCD200+RT	1111,433	34,52	2,47E+00	8,71E-01	8,71E-01	0,009	2,027
		35,24					
SD7_MO_vCD200+RT	1111,433	31,03	4,34E+01	9,68E+00	9,68E+00	0,010	1,980
		30,58					
SD8_MO_vCD200+RT	1111,433	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
		40,04					
SD9_MO_vCD200+RT	1111,433	30,29	5,33E+01	1,14E+01	1,14E+01	0,089	1,049
		30,72					
SD10_MO_vCD200+RT	1111,433	31,03	3,94E+01	4,24E+00	4,24E+00	0,005	2,283
		30,82					
SD6_MO_vCD200-RT	1371,971	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD7_MO_vCD200-RT	1371,971	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD8_MO_vCD200-RT	1371,971	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD9_MO_vCD200-RT	1371,971	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					

SD10_MO_vCD200-RT	1371,971	39,65 No Ct	8,21E-02	No Ct			
SD11_MO_vCD200+RT	1111,433	No Ct No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
SD12_MO_vCD200+RT	1111,433	No Ct No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
SD14_MO_vCD200+RT	1111,433	No Ct No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
SD15_MO_vCD200+RT	1111,433	No Ct No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
SD11_MO_vCD200-RT	1371,971	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD12_MO_vCD200-RT	1371,971	No Ct 38,10	No Ct	No Ct			
SD14_MO_vCD200-RT	1371,971	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD15_MO_vCD200-RT	1371,971	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD16_MO_vCD200+RT	1074,409	37,65 38,79	2,44E-01	1,32E-01	1,32E-01	0,000	3,887
SD17_MO_vCD200+RT	1074,409	37,68 37,97	3,00E-01	4,35E-02	4,35E-02	0,000	4,632
SD18_MO_vCD200+RT	1074,409	No Ct No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	#NUM!
SD19_MO_vCD200+RT	1074,409	37,61 40,11	2,04E-01	2,04E-01	2,04E-01	0,000	3,864
SD20_MO_vCD200+RT	1074,409	37,68 38,00	2,97E-01	4,70E-02	4,70E-02	0,000	4,343
SD16_MO_vCD200-RT	1359,287	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD17_MO_vCD200-RT	1359,287	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD18_MO_vCD200-RT	1359,287	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD19_MO_vCD200-RT	1359,287	39,21 No Ct	1,12E-01	No Ct			
SD20_MO_vCD200-RT	1359,287	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD21_MO_vCD200+RT	1074,409	42,98 42,46	9,50E-03	2,45E-03	2,45E-03	0,000	5,667
SD22_MO_vCD200+RT	1074,409	41,17 41,70	2,37E-02	6,18E-03	6,18E-03	0,000	5,394
SD23_MO_vCD200+RT	1074,409	37,63 38,10	2,94E-01	6,88E-02	6,88E-02	0,000	4,279
SD24_MO_vCD200+RT	1074,409	39,10 39,95	9,34E-02	3,85E-02	3,85E-02	0,000	4,904
SD25_MO_vCD200+RT	1074,409	40,68 41,84	2,85E-02	1,57E-02	1,57E-02	0,000	4,475
SD21_MO_vCD200-RT	1359,287	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD22_MO_vCD200-RT	1359,287	38,19 No Ct	2,30E-01	No Ct			
SD23_MO_vCD200-RT	1359,287	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD24_MO_vCD200-RT	1359,287	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD25_MO_vCD200-RT	1359,287	No Ct	No Ct	No Ct			

		No Ct					
SD26_MO_vCD200+RT	1074,409	No Ct 43,38	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
SD26_MO_vCD200+RT	1074,409	No Ct No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
SD28_MO_vCD200+RT	1074,409	No Ct No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
SD29_MO_vCD200+RT	1074,409	No Ct 44,15	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
SD30_MO_vCD200+RT	1074,409	No Ct No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
SD26_MO_vCD200-RT	1359,287	40,20 No Ct	5,56E-02	No Ct			
SD27_MO_vCD200-RT	1359,287	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD28_MO_vCD200-RT	1359,287	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD29_MO_vCD200-RT	1359,287	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD30_MO_vCD200-RT	1359,287	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD31_MO_vCD200+RT	1074,409	42,84 41,99	1,21E-02	5,00E-03	5,00E-03	0,000	4,951
SD32_MO_vCD200+RT	1074,409	No Ct No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	#NUM!
SD33_MO_vCD200+RT	1074,409	No Ct No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	#NUM!
SD34_MO_vCD200+RT	1074,409	43,29 44,39	4,55E-03	2,38E-03	2,38E-03	0,000	5,234
SD35_MO_vCD200+RT	1074,409	No Ct No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	#NUM!
SD31_MO_vCD200-RT	1359,287	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD32_MO_vCD200-RT	1359,287	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD33_MO_vCD200-RT	1359,287	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD34_MO_vCD200-RT	1359,287	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			
SD35_MO_vCD200-RT	1359,287	No Ct No Ct	No Ct	No Ct			

Goup	mean value vCD200/cmhc	standard deviation	mittelwert log10 (vCD200/cmhc)	Stabwn log10 vCD200/cmhc	Stabwn log10 (vCD200/cmhc)/Wurzel(n)
SD1-SD5 mock	0,00E+00	0,00E+00	-7,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
SD6-SD10 wt d2	2,29E-02	3,34E-02	-1,83E+00	4,68E-01	2,34E-01
SD11-SD15 ko d2	0,00E+00	0,00E+00	-7,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
SD16-SD20 rev d2	5,14E-05	5,19E-05	-4,28E+00	3,17E-01	1,83E-01
SD21-SD25 wt d6	2,10E-05	1,93E-05	-4,94E+00	5,27E-01	2,36E-01
SD26-SD30 ko d6	0,00E+00	0,00E+00	-7,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
SD31-SD35 rev d6	3,40E-06	4,50E-06	-5,09E+00	1,42E-01	1,00E-01

8.5.4 Rohdaten TaqMan-PCR CD200R

Well Name	Threshold (dR)	Ct (dR)	Quantity (copies)	Quantity Avg. (copies)	-RT bereinigt	CD200R/ cmyc	log CD200R/ cmyc																																																																																																																																																																																																																									
SD1_MO_CD200R+RT	962,362	25,33	2,33E+04	7,52E+02	7,52E+02	2,411	0,382																																																																																																																																																																																																																									
		25,26						SD2_MO_CD200R+RT	962,362	26,74	9,05E+03	1,38E+02	1,38E+02	3,087	0,490	26,77	SD3_MO_CD200R+RT	962,362	25,17	2,19E+04	4,78E+03	4,78E+03	15,503	1,190	25,65	SD4_MO_CD200R+RT	962,362	24,49	3,55E+04	5,00E+03	5,00E+03	7,697	0,886	24,80	SD5_MO_CD200R+RT	962,362	25,38	2,10E+04	1,29E+03	1,29E+03	2,315	0,365	25,52	SD1_MO_CD200R-RT	2019,91	38,52	4,47E+00	No Ct				No Ct	SD2_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD3_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD4_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD5_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD6_MO_CD200R+RT	962,362	29,19	1,50E+03	5,11E+02	5,11E+02	5,509	0,741	29,95	SD7_MO_CD200R+RT	962,362	24,97	2,85E+04	3,09E+02	3,09E+02	0,334	0,476	24,99	SD8_MO_CD200R+RT	962,362	23,69	9,95E+04	4,81E+04	4,81E+04	95,570	1,980	22,59	SD9_MO_CD200R+RT	962,362	25,46	1,95E+04	2,00E+03	2,00E+03	15,706	1,196	25,69	SD10_MO_CD200R+RT	962,362	24,91	3,56E+04	8,32E+03	8,32E+03	10,219	1,009	24,40	SD6_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD7_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD8_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD9_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD10_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD11_MO_CD200R+RT	962,362	25,98	1,42E+04	9,37E+02	9,37E+02	79,239	1,899	26,12	SD12_MO_CD200R+RT	962,362	25,15	2,27E+04	4,01E+03	4,01E+03	20,602	1,314	25,53	SD13_MO_CD200R+RT	962,362	25,75	1,66E+04	8,94E+02	8,94E+02	2,794	0,446	25,87	SD14_MO_CD200R+RT	962,362	25,09	2,37E+04	3,88E+03	3,88E+03	6,716	0,827	25,45	SD11_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD12_MO_CD200R-RT
SD2_MO_CD200R+RT	962,362	26,74	9,05E+03	1,38E+02	1,38E+02	3,087	0,490																																																																																																																																																																																																																									
		26,77						SD3_MO_CD200R+RT	962,362	25,17	2,19E+04	4,78E+03	4,78E+03	15,503	1,190	25,65	SD4_MO_CD200R+RT	962,362	24,49	3,55E+04	5,00E+03	5,00E+03	7,697	0,886	24,80	SD5_MO_CD200R+RT	962,362	25,38	2,10E+04	1,29E+03	1,29E+03	2,315	0,365	25,52	SD1_MO_CD200R-RT	2019,91	38,52	4,47E+00	No Ct				No Ct	SD2_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD3_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD4_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD5_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD6_MO_CD200R+RT	962,362	29,19	1,50E+03	5,11E+02	5,11E+02	5,509	0,741	29,95	SD7_MO_CD200R+RT	962,362	24,97	2,85E+04	3,09E+02	3,09E+02	0,334	0,476	24,99	SD8_MO_CD200R+RT	962,362	23,69	9,95E+04	4,81E+04	4,81E+04	95,570	1,980	22,59	SD9_MO_CD200R+RT	962,362	25,46	1,95E+04	2,00E+03	2,00E+03	15,706	1,196	25,69	SD10_MO_CD200R+RT	962,362	24,91	3,56E+04	8,32E+03	8,32E+03	10,219	1,009	24,40	SD6_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD7_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD8_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD9_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD10_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD11_MO_CD200R+RT	962,362	25,98	1,42E+04	9,37E+02	9,37E+02	79,239	1,899	26,12	SD12_MO_CD200R+RT	962,362	25,15	2,27E+04	4,01E+03	4,01E+03	20,602	1,314	25,53	SD13_MO_CD200R+RT	962,362	25,75	1,66E+04	8,94E+02	8,94E+02	2,794	0,446	25,87	SD14_MO_CD200R+RT	962,362	25,09	2,37E+04	3,88E+03	3,88E+03	6,716	0,827	25,45	SD11_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD12_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct					
SD3_MO_CD200R+RT	962,362	25,17	2,19E+04	4,78E+03	4,78E+03	15,503	1,190																																																																																																																																																																																																																									
		25,65						SD4_MO_CD200R+RT	962,362	24,49	3,55E+04	5,00E+03	5,00E+03	7,697	0,886	24,80	SD5_MO_CD200R+RT	962,362	25,38	2,10E+04	1,29E+03	1,29E+03	2,315	0,365	25,52	SD1_MO_CD200R-RT	2019,91	38,52	4,47E+00	No Ct				No Ct	SD2_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD3_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD4_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD5_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD6_MO_CD200R+RT	962,362	29,19	1,50E+03	5,11E+02	5,11E+02	5,509	0,741	29,95	SD7_MO_CD200R+RT	962,362	24,97	2,85E+04	3,09E+02	3,09E+02	0,334	0,476	24,99	SD8_MO_CD200R+RT	962,362	23,69	9,95E+04	4,81E+04	4,81E+04	95,570	1,980	22,59	SD9_MO_CD200R+RT	962,362	25,46	1,95E+04	2,00E+03	2,00E+03	15,706	1,196	25,69	SD10_MO_CD200R+RT	962,362	24,91	3,56E+04	8,32E+03	8,32E+03	10,219	1,009	24,40	SD6_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD7_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD8_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD9_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD10_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD11_MO_CD200R+RT	962,362	25,98	1,42E+04	9,37E+02	9,37E+02	79,239	1,899	26,12	SD12_MO_CD200R+RT	962,362	25,15	2,27E+04	4,01E+03	4,01E+03	20,602	1,314	25,53	SD13_MO_CD200R+RT	962,362	25,75	1,66E+04	8,94E+02	8,94E+02	2,794	0,446	25,87	SD14_MO_CD200R+RT	962,362	25,09	2,37E+04	3,88E+03	3,88E+03	6,716	0,827	25,45	SD11_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD12_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct														
SD4_MO_CD200R+RT	962,362	24,49	3,55E+04	5,00E+03	5,00E+03	7,697	0,886																																																																																																																																																																																																																									
		24,80						SD5_MO_CD200R+RT	962,362	25,38	2,10E+04	1,29E+03	1,29E+03	2,315	0,365	25,52	SD1_MO_CD200R-RT	2019,91	38,52	4,47E+00	No Ct				No Ct	SD2_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD3_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD4_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD5_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD6_MO_CD200R+RT	962,362	29,19	1,50E+03	5,11E+02	5,11E+02	5,509	0,741	29,95	SD7_MO_CD200R+RT	962,362	24,97	2,85E+04	3,09E+02	3,09E+02	0,334	0,476	24,99	SD8_MO_CD200R+RT	962,362	23,69	9,95E+04	4,81E+04	4,81E+04	95,570	1,980	22,59	SD9_MO_CD200R+RT	962,362	25,46	1,95E+04	2,00E+03	2,00E+03	15,706	1,196	25,69	SD10_MO_CD200R+RT	962,362	24,91	3,56E+04	8,32E+03	8,32E+03	10,219	1,009	24,40	SD6_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD7_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD8_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD9_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD10_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD11_MO_CD200R+RT	962,362	25,98	1,42E+04	9,37E+02	9,37E+02	79,239	1,899	26,12	SD12_MO_CD200R+RT	962,362	25,15	2,27E+04	4,01E+03	4,01E+03	20,602	1,314	25,53	SD13_MO_CD200R+RT	962,362	25,75	1,66E+04	8,94E+02	8,94E+02	2,794	0,446	25,87	SD14_MO_CD200R+RT	962,362	25,09	2,37E+04	3,88E+03	3,88E+03	6,716	0,827	25,45	SD11_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD12_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																							
SD5_MO_CD200R+RT	962,362	25,38	2,10E+04	1,29E+03	1,29E+03	2,315	0,365																																																																																																																																																																																																																									
		25,52						SD1_MO_CD200R-RT	2019,91	38,52	4,47E+00	No Ct				No Ct	SD2_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD3_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD4_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD5_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD6_MO_CD200R+RT	962,362	29,19	1,50E+03	5,11E+02	5,11E+02	5,509	0,741	29,95	SD7_MO_CD200R+RT	962,362	24,97	2,85E+04	3,09E+02	3,09E+02	0,334	0,476	24,99	SD8_MO_CD200R+RT	962,362	23,69	9,95E+04	4,81E+04	4,81E+04	95,570	1,980	22,59	SD9_MO_CD200R+RT	962,362	25,46	1,95E+04	2,00E+03	2,00E+03	15,706	1,196	25,69	SD10_MO_CD200R+RT	962,362	24,91	3,56E+04	8,32E+03	8,32E+03	10,219	1,009	24,40	SD6_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD7_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD8_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD9_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD10_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD11_MO_CD200R+RT	962,362	25,98	1,42E+04	9,37E+02	9,37E+02	79,239	1,899	26,12	SD12_MO_CD200R+RT	962,362	25,15	2,27E+04	4,01E+03	4,01E+03	20,602	1,314	25,53	SD13_MO_CD200R+RT	962,362	25,75	1,66E+04	8,94E+02	8,94E+02	2,794	0,446	25,87	SD14_MO_CD200R+RT	962,362	25,09	2,37E+04	3,88E+03	3,88E+03	6,716	0,827	25,45	SD11_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD12_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																
SD1_MO_CD200R-RT	2019,91	38,52	4,47E+00	No Ct																																																																																																																																																																																																																												
		No Ct						SD2_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD3_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD4_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD5_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD6_MO_CD200R+RT	962,362	29,19	1,50E+03	5,11E+02	5,11E+02	5,509	0,741	29,95	SD7_MO_CD200R+RT	962,362	24,97	2,85E+04	3,09E+02	3,09E+02	0,334	0,476	24,99	SD8_MO_CD200R+RT	962,362	23,69	9,95E+04	4,81E+04	4,81E+04	95,570	1,980	22,59	SD9_MO_CD200R+RT	962,362	25,46	1,95E+04	2,00E+03	2,00E+03	15,706	1,196	25,69	SD10_MO_CD200R+RT	962,362	24,91	3,56E+04	8,32E+03	8,32E+03	10,219	1,009	24,40	SD6_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD7_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD8_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD9_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD10_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD11_MO_CD200R+RT	962,362	25,98	1,42E+04	9,37E+02	9,37E+02	79,239	1,899	26,12	SD12_MO_CD200R+RT	962,362	25,15	2,27E+04	4,01E+03	4,01E+03	20,602	1,314	25,53	SD13_MO_CD200R+RT	962,362	25,75	1,66E+04	8,94E+02	8,94E+02	2,794	0,446	25,87	SD14_MO_CD200R+RT	962,362	25,09	2,37E+04	3,88E+03	3,88E+03	6,716	0,827	25,45	SD11_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD12_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																									
SD2_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																																																																												
		No Ct						SD3_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD4_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD5_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD6_MO_CD200R+RT	962,362	29,19	1,50E+03	5,11E+02	5,11E+02	5,509	0,741	29,95	SD7_MO_CD200R+RT	962,362	24,97	2,85E+04	3,09E+02	3,09E+02	0,334	0,476	24,99	SD8_MO_CD200R+RT	962,362	23,69	9,95E+04	4,81E+04	4,81E+04	95,570	1,980	22,59	SD9_MO_CD200R+RT	962,362	25,46	1,95E+04	2,00E+03	2,00E+03	15,706	1,196	25,69	SD10_MO_CD200R+RT	962,362	24,91	3,56E+04	8,32E+03	8,32E+03	10,219	1,009	24,40	SD6_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD7_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD8_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD9_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD10_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD11_MO_CD200R+RT	962,362	25,98	1,42E+04	9,37E+02	9,37E+02	79,239	1,899	26,12	SD12_MO_CD200R+RT	962,362	25,15	2,27E+04	4,01E+03	4,01E+03	20,602	1,314	25,53	SD13_MO_CD200R+RT	962,362	25,75	1,66E+04	8,94E+02	8,94E+02	2,794	0,446	25,87	SD14_MO_CD200R+RT	962,362	25,09	2,37E+04	3,88E+03	3,88E+03	6,716	0,827	25,45	SD11_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD12_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																																		
SD3_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																																																																												
		No Ct						SD4_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD5_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD6_MO_CD200R+RT	962,362	29,19	1,50E+03	5,11E+02	5,11E+02	5,509	0,741	29,95	SD7_MO_CD200R+RT	962,362	24,97	2,85E+04	3,09E+02	3,09E+02	0,334	0,476	24,99	SD8_MO_CD200R+RT	962,362	23,69	9,95E+04	4,81E+04	4,81E+04	95,570	1,980	22,59	SD9_MO_CD200R+RT	962,362	25,46	1,95E+04	2,00E+03	2,00E+03	15,706	1,196	25,69	SD10_MO_CD200R+RT	962,362	24,91	3,56E+04	8,32E+03	8,32E+03	10,219	1,009	24,40	SD6_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD7_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD8_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD9_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD10_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD11_MO_CD200R+RT	962,362	25,98	1,42E+04	9,37E+02	9,37E+02	79,239	1,899	26,12	SD12_MO_CD200R+RT	962,362	25,15	2,27E+04	4,01E+03	4,01E+03	20,602	1,314	25,53	SD13_MO_CD200R+RT	962,362	25,75	1,66E+04	8,94E+02	8,94E+02	2,794	0,446	25,87	SD14_MO_CD200R+RT	962,362	25,09	2,37E+04	3,88E+03	3,88E+03	6,716	0,827	25,45	SD11_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD12_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																																											
SD4_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																																																																												
		No Ct						SD5_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD6_MO_CD200R+RT	962,362	29,19	1,50E+03	5,11E+02	5,11E+02	5,509	0,741	29,95	SD7_MO_CD200R+RT	962,362	24,97	2,85E+04	3,09E+02	3,09E+02	0,334	0,476	24,99	SD8_MO_CD200R+RT	962,362	23,69	9,95E+04	4,81E+04	4,81E+04	95,570	1,980	22,59	SD9_MO_CD200R+RT	962,362	25,46	1,95E+04	2,00E+03	2,00E+03	15,706	1,196	25,69	SD10_MO_CD200R+RT	962,362	24,91	3,56E+04	8,32E+03	8,32E+03	10,219	1,009	24,40	SD6_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD7_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD8_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD9_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD10_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD11_MO_CD200R+RT	962,362	25,98	1,42E+04	9,37E+02	9,37E+02	79,239	1,899	26,12	SD12_MO_CD200R+RT	962,362	25,15	2,27E+04	4,01E+03	4,01E+03	20,602	1,314	25,53	SD13_MO_CD200R+RT	962,362	25,75	1,66E+04	8,94E+02	8,94E+02	2,794	0,446	25,87	SD14_MO_CD200R+RT	962,362	25,09	2,37E+04	3,88E+03	3,88E+03	6,716	0,827	25,45	SD11_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD12_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																																																				
SD5_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																																																																												
		No Ct						SD6_MO_CD200R+RT	962,362	29,19	1,50E+03	5,11E+02	5,11E+02	5,509	0,741	29,95	SD7_MO_CD200R+RT	962,362	24,97	2,85E+04	3,09E+02	3,09E+02	0,334	0,476	24,99	SD8_MO_CD200R+RT	962,362	23,69	9,95E+04	4,81E+04	4,81E+04	95,570	1,980	22,59	SD9_MO_CD200R+RT	962,362	25,46	1,95E+04	2,00E+03	2,00E+03	15,706	1,196	25,69	SD10_MO_CD200R+RT	962,362	24,91	3,56E+04	8,32E+03	8,32E+03	10,219	1,009	24,40	SD6_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD7_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD8_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD9_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD10_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD11_MO_CD200R+RT	962,362	25,98	1,42E+04	9,37E+02	9,37E+02	79,239	1,899	26,12	SD12_MO_CD200R+RT	962,362	25,15	2,27E+04	4,01E+03	4,01E+03	20,602	1,314	25,53	SD13_MO_CD200R+RT	962,362	25,75	1,66E+04	8,94E+02	8,94E+02	2,794	0,446	25,87	SD14_MO_CD200R+RT	962,362	25,09	2,37E+04	3,88E+03	3,88E+03	6,716	0,827	25,45	SD11_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD12_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																																																													
SD6_MO_CD200R+RT	962,362	29,19	1,50E+03	5,11E+02	5,11E+02	5,509	0,741																																																																																																																																																																																																																									
		29,95						SD7_MO_CD200R+RT	962,362	24,97	2,85E+04	3,09E+02	3,09E+02	0,334	0,476	24,99	SD8_MO_CD200R+RT	962,362	23,69	9,95E+04	4,81E+04	4,81E+04	95,570	1,980	22,59	SD9_MO_CD200R+RT	962,362	25,46	1,95E+04	2,00E+03	2,00E+03	15,706	1,196	25,69	SD10_MO_CD200R+RT	962,362	24,91	3,56E+04	8,32E+03	8,32E+03	10,219	1,009	24,40	SD6_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD7_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD8_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD9_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD10_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD11_MO_CD200R+RT	962,362	25,98	1,42E+04	9,37E+02	9,37E+02	79,239	1,899	26,12	SD12_MO_CD200R+RT	962,362	25,15	2,27E+04	4,01E+03	4,01E+03	20,602	1,314	25,53	SD13_MO_CD200R+RT	962,362	25,75	1,66E+04	8,94E+02	8,94E+02	2,794	0,446	25,87	SD14_MO_CD200R+RT	962,362	25,09	2,37E+04	3,88E+03	3,88E+03	6,716	0,827	25,45	SD11_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD12_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																						
SD7_MO_CD200R+RT	962,362	24,97	2,85E+04	3,09E+02	3,09E+02	0,334	0,476																																																																																																																																																																																																																									
		24,99						SD8_MO_CD200R+RT	962,362	23,69	9,95E+04	4,81E+04	4,81E+04	95,570	1,980	22,59	SD9_MO_CD200R+RT	962,362	25,46	1,95E+04	2,00E+03	2,00E+03	15,706	1,196	25,69	SD10_MO_CD200R+RT	962,362	24,91	3,56E+04	8,32E+03	8,32E+03	10,219	1,009	24,40	SD6_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD7_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD8_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD9_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD10_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD11_MO_CD200R+RT	962,362	25,98	1,42E+04	9,37E+02	9,37E+02	79,239	1,899	26,12	SD12_MO_CD200R+RT	962,362	25,15	2,27E+04	4,01E+03	4,01E+03	20,602	1,314	25,53	SD13_MO_CD200R+RT	962,362	25,75	1,66E+04	8,94E+02	8,94E+02	2,794	0,446	25,87	SD14_MO_CD200R+RT	962,362	25,09	2,37E+04	3,88E+03	3,88E+03	6,716	0,827	25,45	SD11_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD12_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																															
SD8_MO_CD200R+RT	962,362	23,69	9,95E+04	4,81E+04	4,81E+04	95,570	1,980																																																																																																																																																																																																																									
		22,59						SD9_MO_CD200R+RT	962,362	25,46	1,95E+04	2,00E+03	2,00E+03	15,706	1,196	25,69	SD10_MO_CD200R+RT	962,362	24,91	3,56E+04	8,32E+03	8,32E+03	10,219	1,009	24,40	SD6_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD7_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD8_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD9_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD10_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD11_MO_CD200R+RT	962,362	25,98	1,42E+04	9,37E+02	9,37E+02	79,239	1,899	26,12	SD12_MO_CD200R+RT	962,362	25,15	2,27E+04	4,01E+03	4,01E+03	20,602	1,314	25,53	SD13_MO_CD200R+RT	962,362	25,75	1,66E+04	8,94E+02	8,94E+02	2,794	0,446	25,87	SD14_MO_CD200R+RT	962,362	25,09	2,37E+04	3,88E+03	3,88E+03	6,716	0,827	25,45	SD11_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD12_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																								
SD9_MO_CD200R+RT	962,362	25,46	1,95E+04	2,00E+03	2,00E+03	15,706	1,196																																																																																																																																																																																																																									
		25,69						SD10_MO_CD200R+RT	962,362	24,91	3,56E+04	8,32E+03	8,32E+03	10,219	1,009	24,40	SD6_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD7_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD8_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD9_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD10_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD11_MO_CD200R+RT	962,362	25,98	1,42E+04	9,37E+02	9,37E+02	79,239	1,899	26,12	SD12_MO_CD200R+RT	962,362	25,15	2,27E+04	4,01E+03	4,01E+03	20,602	1,314	25,53	SD13_MO_CD200R+RT	962,362	25,75	1,66E+04	8,94E+02	8,94E+02	2,794	0,446	25,87	SD14_MO_CD200R+RT	962,362	25,09	2,37E+04	3,88E+03	3,88E+03	6,716	0,827	25,45	SD11_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD12_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																	
SD10_MO_CD200R+RT	962,362	24,91	3,56E+04	8,32E+03	8,32E+03	10,219	1,009																																																																																																																																																																																																																									
		24,40						SD6_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD7_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD8_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD9_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD10_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD11_MO_CD200R+RT	962,362	25,98	1,42E+04	9,37E+02	9,37E+02	79,239	1,899	26,12	SD12_MO_CD200R+RT	962,362	25,15	2,27E+04	4,01E+03	4,01E+03	20,602	1,314	25,53	SD13_MO_CD200R+RT	962,362	25,75	1,66E+04	8,94E+02	8,94E+02	2,794	0,446	25,87	SD14_MO_CD200R+RT	962,362	25,09	2,37E+04	3,88E+03	3,88E+03	6,716	0,827	25,45	SD11_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD12_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																										
SD6_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																																																																												
		No Ct						SD7_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD8_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD9_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD10_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD11_MO_CD200R+RT	962,362	25,98	1,42E+04	9,37E+02	9,37E+02	79,239	1,899	26,12	SD12_MO_CD200R+RT	962,362	25,15	2,27E+04	4,01E+03	4,01E+03	20,602	1,314	25,53	SD13_MO_CD200R+RT	962,362	25,75	1,66E+04	8,94E+02	8,94E+02	2,794	0,446	25,87	SD14_MO_CD200R+RT	962,362	25,09	2,37E+04	3,88E+03	3,88E+03	6,716	0,827	25,45	SD11_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD12_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																			
SD7_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																																																																												
		No Ct						SD8_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD9_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD10_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD11_MO_CD200R+RT	962,362	25,98	1,42E+04	9,37E+02	9,37E+02	79,239	1,899	26,12	SD12_MO_CD200R+RT	962,362	25,15	2,27E+04	4,01E+03	4,01E+03	20,602	1,314	25,53	SD13_MO_CD200R+RT	962,362	25,75	1,66E+04	8,94E+02	8,94E+02	2,794	0,446	25,87	SD14_MO_CD200R+RT	962,362	25,09	2,37E+04	3,88E+03	3,88E+03	6,716	0,827	25,45	SD11_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD12_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																												
SD8_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																																																																												
		No Ct						SD9_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD10_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD11_MO_CD200R+RT	962,362	25,98	1,42E+04	9,37E+02	9,37E+02	79,239	1,899	26,12	SD12_MO_CD200R+RT	962,362	25,15	2,27E+04	4,01E+03	4,01E+03	20,602	1,314	25,53	SD13_MO_CD200R+RT	962,362	25,75	1,66E+04	8,94E+02	8,94E+02	2,794	0,446	25,87	SD14_MO_CD200R+RT	962,362	25,09	2,37E+04	3,88E+03	3,88E+03	6,716	0,827	25,45	SD11_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD12_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																					
SD9_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																																																																												
		No Ct						SD10_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD11_MO_CD200R+RT	962,362	25,98	1,42E+04	9,37E+02	9,37E+02	79,239	1,899	26,12	SD12_MO_CD200R+RT	962,362	25,15	2,27E+04	4,01E+03	4,01E+03	20,602	1,314	25,53	SD13_MO_CD200R+RT	962,362	25,75	1,66E+04	8,94E+02	8,94E+02	2,794	0,446	25,87	SD14_MO_CD200R+RT	962,362	25,09	2,37E+04	3,88E+03	3,88E+03	6,716	0,827	25,45	SD11_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD12_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																														
SD10_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																																																																												
		No Ct						SD11_MO_CD200R+RT	962,362	25,98	1,42E+04	9,37E+02	9,37E+02	79,239	1,899	26,12	SD12_MO_CD200R+RT	962,362	25,15	2,27E+04	4,01E+03	4,01E+03	20,602	1,314	25,53	SD13_MO_CD200R+RT	962,362	25,75	1,66E+04	8,94E+02	8,94E+02	2,794	0,446	25,87	SD14_MO_CD200R+RT	962,362	25,09	2,37E+04	3,88E+03	3,88E+03	6,716	0,827	25,45	SD11_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD12_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																							
SD11_MO_CD200R+RT	962,362	25,98	1,42E+04	9,37E+02	9,37E+02	79,239	1,899																																																																																																																																																																																																																									
		26,12						SD12_MO_CD200R+RT	962,362	25,15	2,27E+04	4,01E+03	4,01E+03	20,602	1,314	25,53	SD13_MO_CD200R+RT	962,362	25,75	1,66E+04	8,94E+02	8,94E+02	2,794	0,446	25,87	SD14_MO_CD200R+RT	962,362	25,09	2,37E+04	3,88E+03	3,88E+03	6,716	0,827	25,45	SD11_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD12_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																																
SD12_MO_CD200R+RT	962,362	25,15	2,27E+04	4,01E+03	4,01E+03	20,602	1,314																																																																																																																																																																																																																									
		25,53						SD13_MO_CD200R+RT	962,362	25,75	1,66E+04	8,94E+02	8,94E+02	2,794	0,446	25,87	SD14_MO_CD200R+RT	962,362	25,09	2,37E+04	3,88E+03	3,88E+03	6,716	0,827	25,45	SD11_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD12_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																																									
SD13_MO_CD200R+RT	962,362	25,75	1,66E+04	8,94E+02	8,94E+02	2,794	0,446																																																																																																																																																																																																																									
		25,87						SD14_MO_CD200R+RT	962,362	25,09	2,37E+04	3,88E+03	3,88E+03	6,716	0,827	25,45	SD11_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD12_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																																																		
SD14_MO_CD200R+RT	962,362	25,09	2,37E+04	3,88E+03	3,88E+03	6,716	0,827																																																																																																																																																																																																																									
		25,45						SD11_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	SD12_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																																																											
SD11_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																																																																												
		No Ct						SD12_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																																																																				
SD12_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																																																																												

		No Ct					
SD13_MO_CD200R-RT	2019,91	38,05	6,05E+00	No Ct			
		No Ct					
SD14_MO_CD200R-RT	2019,91	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD16_MO_CD200R+RT	1019,261	24,01	8,94E+04	5,12E+04	5,12E+04	50,344	1,702
		22,69					
SD17_MO_CD200R+RT	1019,261	24,52	4,96E+04	1,61E+04	1,61E+04	8,649	0,937
		23,80					
SD18_MO_CD200R+RT	1019,261	26,03	1,95E+04	7,16E+03	7,16E+03	17,458	1,242
		25,21					
SD19_MO_CD200R+RT	1019,261	25,56	2,73E+04	1,11E+04	1,11E+04	7,420	0,870
		24,65					
SD20_MO_CD200R+RT	1019,261	25,50	2,66E+04	8,85E+03	8,85E+03	8,548	0,932
		24,76					
SD16_MO_CD200R-RT	1917,24	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD17_MO_CD200R-RT	1917,24	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD18_MO_CD200R-RT	1917,24	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD19_MO_CD200R-RT	1917,24	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD20_MO_CD200R-RT	1917,24	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD21_MO_CD200R+RT	1019,261	23,91	6,00E+04	4,51E+03	4,51E+03	3,960	0,598
		23,75					
SD22_MO_CD200R+RT	1019,261	22,48	1,28E+05	2,10E+04	2,10E+04	13,734	1,138
		22,84					
SD23_MO_CD200R+RT	1019,261	22,92	1,17E+05	1,31E+04	1,31E+04	9,992	1,000
		22,68					
SD24_MO_CD200R+RT	1019,261	21,91	1,88E+05	2,86E+04	2,86E+04	9,255	0,966
		22,24					
SD25_MO_CD200R+RT	1019,261	23,28	9,64E+04	1,50E+04	1,50E+04	31,926	1,504
		22,93					
SD21_MO_CD200R-RT	1917,24	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD22_MO_CD200R-RT	1917,24	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD23_MO_CD200R-RT	1917,24	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD24_MO_CD200R-RT	1917,24	38,40	4,81E+00	No Ct			
		No Ct					
SD25_MO_CD200R-RT	1917,24	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD26_MO_CD200R+RT	1019,261	26,48	1,13E+04	6,79E+02	6,79E+02	0,813	0,090
		26,35					
SD27_MO_CD200R+RT	1019,261	23,29	8,01E+04	6,80E+03	6,80E+03	8,870	0,948
		23,48					
SD28_MO_CD200R+RT	1019,261	23,28	8,13E+04	5,67E+03	5,65E+03	4,887	0,689
		23,44					
SD29_MO_CD200R+RT	1019,261	22,82	1,11E+05	6,18E+03	6,18E+03	43,324	1,637
		22,95					
SD30_MO_CD200R+RT	1019,261	24,78	3,28E+04	4,64E+02	4,64E+02	0,303	0,519
		24,74					
SD26_MO_CD200R-RT	1917,24	No Ct	No Ct	No Ct			

		No Ct					
SD27_MO_CD200R-RT	1917,24	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD28_MO_CD200R-RT	1917,24	35,55	1,92E+01	1,61E+01			
		37,66					
SD29_MO_CD200R-RT	1917,24	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD30_MO_CD200R-RT	1917,24	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD31_MO_CD200R+RT	1019,261	26,04	1,36E+04	1,03E+03	1,03E+03	2,316	0,365
		26,20					
SD32_MO_CD200R+RT	1019,261	24,26	4,15E+04	5,43E+03	5,43E+03	15,270	1,184
		24,55					
SD33_MO_CD200R+RT	1019,261	27,16	6,92E+03	4,88E+01	4,88E+01	1,023	0,010
		27,17					
SD34_MO_CD200R+RT	1019,261	24,88	3,12E+04	1,26E+03	1,26E+03	3,091	0,490
		24,79					
SD35_MO_CD200R+RT	1019,261	24,79	3,61E+04	5,49E+03	5,49E+03	6,634	0,822
		24,45					
SD31_MO_CD200R-RT	1917,24	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD32_MO_CD200R-RT	1917,24	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD33_MO_CD200R-RT	1917,24	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD34_MO_CD200R-RT	1917,24	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					
SD35_MO_CD200R-RT	1917,24	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct					

Goup	mean value CD200R/cmyc	standard deviation	mittelwert log10 (CD200R/cmyc)	Stabwn log10 CD200R/cmyc	Stabwn log10 (CD200R/cmyc)/Wurzel(n)
SD1-SD5 mock	6,20E+00	5,06E+00	6,63E-01	3,24E-01	6,49E-02
SD6-SD10 wt d2	2,55E+01	3,54E+01	8,90E-01	7,98E-01	3,57E-01
SD11-SD15 ko d2	2,73E+01	3,07E+01	1,12E+00	5,44E-01	2,72E-01
SD16-SD20 rev d2	1,05E+01	4,04E+00	9,95E-01	1,45E-01	2,72E-01
SD21-SD25 wt d6	1,38E+01	9,60E+00	1,04E+00	2,92E-01	1,31E-01
SD26-SD30 ko d6	1,16E+01	1,61E+01	5,33E-01	7,63E-01	3,41E-01
SD31-SD35 rev d6	5,67E+00	5,15E+00	5,74E-01	4,01E-01	1,79E-01

8.5.5 Rohdaten TaqMan-PCR c-myc

Well Name	Threshold (dR)	Ct (dR)	Quantity (copies)	Quantity Avg. (copies)	-RT bereinigt
SD1_MO_cMyc+RT	640,251	25,30	6,27E+03	3,12E+02	3,12E+02
		25,21			
SD2_MO_cMyc+RT	640,251	26,64	2,39E+03	4,47E+01	4,47E+01
		26,60			
SD3_MO_cMyc+RT	640,251	25,66	4,91E+03	3,08E+02	3,08E+02
		25,54			
SD4_MO_cMyc+RT	640,251	25,48	5,80E+03	6,50E+02	6,50E+02
		25,26			

SD5_MO_cMyc+RT	640,251	25,75	4,04E+03	5,57E+02	5,57E+02
		26,02			
SD1_MO_cMyc-RT	594,103	No Ct	No Ct	No Ct	
		No Ct			
SD2_MO_cMyc-RT	594,103	No Ct	No Ct	No Ct	
		No Ct			
SD3_MO_cMyc-RT	594,103	No Ct	No Ct	No Ct	
		No Ct			
SD4_MO_cMyc-RT	594,103	No Ct	No Ct	No Ct	
		No Ct			
SD5_MO_cMyc-RT	594,103	No Ct	No Ct	No Ct	
		No Ct			
SD6_MO_cMyc+RT	640,251	28,18	7,27E+02	9,27E+01	9,27E+01
		28,44			
SD7_MO_cMyc+RT	640,251	24,94	8,49E+03	9,24E+02	9,24E+02
		24,72			
SD8_MO_cMyc+RT	640,251	24,93	7,55E+03	5,03E+02	5,03E+02
		25,06			
SD9_MO_cMyc+RT	640,251	25,19	6,67E+03	1,27E+02	1,27E+02
		25,15			
SD10_MO_cMyc+RT	640,251	24,11	1,35E+04	8,14E+02	8,14E+02
		24,23			
SD6_MO_cMyc-RT	594,103	No Ct	No Ct	No Ct	
		36,27			
SD7_MO_cMyc-RT	594,103	No Ct	No Ct	No Ct	
		No Ct			
SD8_MO_cMyc-RT	594,103	No Ct	No Ct	No Ct	
		No Ct			
SD9_MO_cMyc-RT	594,103	No Ct	No Ct	No Ct	
		36,34			
SD10_MO_cMyc-RT	594,103	36,31	2,57E+00	No Ct	
		No Ct			
SD11_MO_cMyc+RT	640,251	25,06	7,18E+03	1,18E+01	1,18E+01
		25,06			
SD12_MO_cMyc+RT	640,251	24,80	8,48E+03	1,94E+02	1,94E+02
		24,85			
SD14_MO_cMyc+RT	640,251	25,20	6,29E+03	3,20E+02	3,20E+02
		25,30			
SD15_MO_cMyc+RT	640,251	24,98	8,02E+03	5,78E+02	5,78E+02
		24,84			
SD11_MO_cMyc-RT	594,103	No Ct	No Ct	No Ct	
		No Ct			
SD12_MO_cMyc-RT	594,103	No Ct	No Ct	No Ct	
		36,27			
SD14_MO_cMyc-RT	594,103	No Ct	No Ct	No Ct	
		No Ct			
SD15_MO_cMyc-RT	594,103	No Ct	No Ct	No Ct	
		No Ct			
SD16_MO_cMyc+RT	771,017	24,44	1,18E+04	1,02E+03	1,02E+03
		24,27			
SD17_MO_cMyc+RT	771,017	23,79	1,63E+04	1,87E+03	1,87E+03
		24,02			
SD18_MO_cMyc+RT	771,017	26,83	1,77E+03	4,10E+02	4,10E+02
		27,30			
SD19_MO_cMyc+RT	771,017	25,23	5,33E+03	1,49E+03	1,49E+03
		25,80			
SD20_MO_cMyc+RT	771,017	25,19	5,84E+03	1,04E+03	1,04E+03

		25,55			
SD16_MO_cMyc-RT	1112,46	No Ct	No Ct	No Ct	
		No Ct			
SD17_MO_cMyc-RT	1112,46	No Ct	No Ct	No Ct	
		No Ct			
SD18_MO_cMyc-RT	1112,46	No Ct	No Ct	No Ct	
		No Ct			
SD19_MO_cMyc-RT	1112,46	No Ct	No Ct	No Ct	
		No Ct			
SD20_MO_cMyc-RT	1112,46	No Ct	No Ct	No Ct	
		No Ct			
SD21_MO_cMyc+RT	771,017	24,42	1,05E+04	1,14E+03	1,14E+03
		24,64			
SD22_MO_cMyc+RT	771,017	23,93	1,49E+04	1,53E+03	1,53E+03
		24,14			
SD23_MO_cMyc+RT	771,017	22,78	3,68E+04	1,31E+03	1,31E+03
		22,71			
SD24_MO_cMyc+RT	771,017	22,37	4,60E+04	3,09E+03	3,09E+03
		22,50			
SD25_MO_cMyc+RT	771,017	23,73	1,87E+04	4,69E+02	4,69E+02
		23,68			
SD21_MO_cMyc-RT	1112,46	No Ct	No Ct	No Ct	
		No Ct			
SD22_MO_cMyc-RT	1112,46	No Ct	No Ct	No Ct	
		37,81			
SD23_MO_cMyc-RT	1112,46	No Ct	No Ct	No Ct	
		No Ct			
SD24_MO_cMyc-RT	1112,46	No Ct	No Ct	No Ct	
		No Ct			
SD25_MO_cMyc-RT	1112,46	No Ct	No Ct	No Ct	
		No Ct			
SD26_MO_cMyc+RT	771,017	25,87	3,47E+03	8,36E+02	8,36E+02
		26,36			
SD27_MO_cMyc+RT	771,017	24,58	1,06E+04	7,66E+02	7,66E+02
		24,44			
SD28_MO_cMyc+RT	771,017	24,05	1,38E+04	1,16E+03	1,16E+03
		24,22			
SD29_MO_cMyc+RT	771,017	23,78	1,76E+04	1,43E+02	1,43E+02
		23,80			
SD30_MO_cMyc+RT	771,017	24,84	9,47E+03	1,53E+03	1,53E+03
		24,52			
SD26_MO_cMyc-RT	1112,46	No Ct	No Ct	No Ct	
		37,54			
SD27_MO_cMyc-RT	1112,46	No Ct	No Ct	No Ct	
		No Ct			
SD28_MO_cMyc-RT	1112,46	36,31	2,34E+00	No Ct	
		36,59			
SD29_MO_cMyc-RT	1112,46	No Ct	No Ct	No Ct	
		No Ct			
SD30_MO_cMyc-RT	1112,46	No Ct	No Ct	No Ct	
		36,85			
SD31_MO_cMyc+RT	771,017	26,81	1,78E+03	4,47E+02	4,47E+02
		27,32			
SD32_MO_cMyc+RT	771,017	26,37	2,61E+03	3,55E+02	3,55E+02
		26,64			
SD33_MO_cMyc+RT	771,017	27,89	9,44E+02	4,77E+01	4,77E+01
		27,99			

SD34_MO_cMyc+RT	771,017	26,21	2,91E+03	4,08E+02	4,08E+02
		26,49			
SD35_MO_cMyc+RT	771,017	25,66	4,12E+03	8,27E+02	8,27E+02
		26,07			
SD31_MO_cMyc-RT	1112,46	36,85	1,75E+00	No Ct	
		No Ct			
SD32_MO_cMyc-RT	1112,46	No Ct	No Ct	No Ct	
		No Ct			
SD33_MO_cMyc-RT	1112,46	No Ct	No Ct	No Ct	
		No Ct			
SD34_MO_cMyc-RT	1112,46	No Ct	No Ct	No Ct	
		No Ct			
SD35_MO_cMyc-RT	1112,46	No Ct	No Ct	No Ct	
		No Ct			

8.6 Rohdaten TaqMan-PCR Milz

Die folgenden Rohdaten stellen die Grundlage der in Abb. 23 gezeigten Ergebnisse dar. Die Übertragung der Daten in eine EXCEL-Datei erfolgte mithilfe des geräteinternen Softwareprogrammes. Im Anschluss an die jeweiligen Rohdaten wird die Berechnung die der Abb. 23 zugrunde liegt angefügt. Für Erläuterungen zur Durchführung der TaqMan-PCRs s. 2.2.18.

8.6.1 Rohdaten TaqMan-PCR iNOS

Well Name	Threshold (dR)	Ct (dR)	Quantity (copies)	Quantity Avg. (copies)	-RT bereinigt	iNOS/cmyc	log iNOS/cmyc
SD1spleen_iNOS+RT	1486,214	33,68	2,61E+02	6,12E+02	6,12E+02	0,004	2,366
		31,76	9,62E+02				
SD2spleen_iNOS+RT	1486,214	30,00	3,20E+03	4,09E+03	4,09E+03	0,048	1,318
		29,34	4,99E+03				
SD3spleen_iNOS+RT	1486,214	32,17	7,31E+02	6,17E+02	6,17E+02	0,004	2,409
		32,72	5,02E+02				
SD4spleen_iNOS+RT	1486,214	32,48	5,90E+02	5,08E+02	5,08E+02	0,003	2,527
		32,96	4,26E+02				
SD5spleen_iNOS+RT	1486,214	35,65	6,85E+01	6,85E+01	6,85E+01	0,002	2,659
		No Ct	No Ct				
SD1spleen_iNOS-RT	1469,389	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD2spleen_iNOS-RT	1469,389	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD3spleen_iNOS-RT	1469,389	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD4spleen_iNOS-RT	1469,389	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD5spleen_iNOS-RT	1469,389	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD6spleen_iNOS+RT	1486,214	29,66	4,02E+03	4,32E+03	4,32E+03	0,066	1,181
		29,46	4,61E+03				
SD7spleen_iNOS+RT	1486,214	29,09	5,92E+03	6,43E+03	6,43E+03	0,080	1,096
		28,86	6,94E+03				

SD8spleen_iNOS+RT	1486,214	30,92	1,71E+03	1,69E+03	1,69E+03	0,019	1,726
		30,96	1,66E+03				
SD9spleen_iNOS+RT	1486,214	27,60	1,63E+04	1,57E+04	1,57E+04	0,156	0,806
		27,70	1,52E+04				
SD10spleen_iNOS+RT	1486,214	27,14	2,22E+04	2,43E+04	2,43E+04	0,212	0,674
		26,89	2,64E+04				
SD6spleen_iNOS-RT	1469,389	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD7spleen_iNOS-RT	1469,389	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD8spleen_iNOS-RT	1469,389	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD9spleen_iNOS-RT	1469,389	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD10spleen_iNOS-RT	1469,389	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD11spleen_iNOS+RT	1486,214	30,56	2,17E+03	2,00E+03	2,00E+03	0,030	1,524
		30,83	1,82E+03				
SD12spleen_iNOS+RT	1486,214	29,72	3,86E+03	4,20E+03	4,20E+03	0,073	1,135
		29,48	4,54E+03				
SD13spleen_iNOS+RT	1486,214	32,15	7,39E+02	6,83E+02	6,83E+02	0,010	1,992
		32,39	6,27E+02				
SD14spleen_iNOS+RT	1486,214	27,93	1,30E+04	1,21E+04	1,21E+04	0,115	0,938
		28,16	1,12E+04				
SD15spleen_iNOS+RT	1486,214	34,53	1,47E+02	1,28E+02	1,28E+02	0,004	2,399
		34,97	1,09E+02				
SD11spleen_iNOS-RT	1469,389	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD12spleen_iNOS-RT	1469,389	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD13spleen_iNOS-RT	1469,389	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD14spleen_iNOS-RT	1469,389	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD15spleen_iNOS-RT	1469,389	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD16spleen_iNOS+RT	906,816	29,61	4,17E+03	3,37E+03	3,37E+03	0,086	1,065
		30,32	2,57E+03				
SD17spleen_iNOS+RT	906,816	28,55	8,53E+03	9,12E+03	9,12E+03	0,156	0,806
		28,36	9,71E+03				
SD18spleen_iNOS+RT	906,816	32,61	5,40E+02	6,00E+02	6,00E+02	0,008	2,124
		32,32	6,60E+02				
SD19spleen_iNOS+RT	906,816	29,34	5,01E+03	5,33E+03	5,33E+03	0,074	1,132
		29,16	5,65E+03				
SD20spleen_iNOS+RT	906,816	28,70	7,74E+03	7,33E+03	7,33E+03	0,117	0,931
		28,86	6,91E+03				
SD16spleen_iNOS-RT	1483,391	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD17spleen_iNOS-RT	1483,391	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD18spleen_iNOS-RT	1483,391	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD19spleen_iNOS-RT	1483,391	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD20spleen_iNOS-RT	1483,391	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD21spleen_iNOS+RT	906,816	32,33	6,56E+02	6,13E+02	6,13E+02	0,011	1,966

		32,53	5,70E+02				
SD22spleen_iNOS+RT	906,816	32,09	7,72E+02	7,47E+02	7,47E+02	0,023	1,638
		32,18	7,23E+02				
SD23spleen_iNOS+RT	906,816	30,19	2,81E+03	3,75E+03	3,75E+03	0,031	1,504
		29,44	4,68E+03				
SD24spleen_iNOS+RT	906,816	30,07	3,03E+03	2,31E+03	2,31E+03	0,018	1,747
		31,02	1,59E+03				
SD25spleen_iNOS+RT	906,816	32,95	4,31E+02	7,39E+02	7,39E+02	0,016	1,783
		31,64	1,05E+03				
SD21spleen_iNOS-RT	1483,391	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD22spleen_iNOS-RT	1483,391	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD23spleen_iNOS-RT	1483,391	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD24spleen_iNOS-RT	1483,391	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD25spleen_iNOS-RT	1483,391	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD26spleen_iNOS+RT	906,816	32,51	5,79E+02	3,60E+02	3,60E+02	0,029	1,542
		34,58	1,42E+02				
SD27spleen_iNOS+RT	906,816	33,09	3,91E+02	2,54E+02	2,54E+02	0,030	1,519
		34,88	1,16E+02				
SD28spleen_iNOS+RT	906,816	32,90	4,43E+02	5,17E+02	5,17E+02	0,036	1,447
		32,48	5,91E+02				
SD29spleen_iNOS+RT	906,816	31,07	1,54E+03	1,59E+03	1,59E+03	0,042	1,375
		30,98	1,64E+03				
SD30spleen_iNOS+RT	906,816	29,59	4,21E+03	4,61E+03	4,61E+03	0,026	1,592
		29,34	5,00E+03				
SD26spleen_iNOS-RT	1483,391	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD27spleen_iNOS-RT	1483,391	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD28spleen_iNOS-RT	1483,391	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD29spleen_iNOS-RT	1483,391	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD30spleen_iNOS-RT	1483,391	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD31spleen_iNOS+RT	906,816	33,53	2,89E+02	4,63E+02	4,63E+02	0,022	1,654
		32,37	6,37E+02				
SD32spleen_iNOS+RT	906,816	34,10	1,96E+02	2,56E+02	2,56E+02	0,006	2,258
		33,41	3,15E+02				
SD33spleen_iNOS+RT	906,816	35,71	6,57E+01	1,52E+02	1,52E+02	0,012	1,910
		33,81	2,39E+02				
SD34spleen_iNOS+RT	906,816	30,81	1,84E+03	1,58E+03	1,58E+03	0,037	1,427
		31,29	1,32E+03				
SD35spleen_iNOS+RT	906,816	34,31	1,70E+02	1,50E+02	1,50E+02	0,024	1,627
		34,70	1,31E+02				
SD31spleen_iNOS-RT	1483,391	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD32spleen_iNOS-RT	1483,391	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD33spleen_iNOS-RT	1483,391	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD34spleen_iNOS-RT	1483,391	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD35spleen_iNOS-RT	1483,391	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				

Goup	mean value iNOS/cmyc	standard deviation	mittelwert log10 (iNOS/cmyc)	Stabwn log10 iNOS/cmyc	Stabwn log10 (iNOS/cmyc)/Wurzel(n)
SD1-SD5 mock	1,23E-02	1,79E-02	-2,26E+00	4,80E-01	9,60E-02
SD6-SD10 wt d2	1,07E-01	6,88E-02	-1,10E+00	3,65E-01	1,63E-01
SD11-SD15 ko d2	4,66E-02	4,21E-02	-1,60E+00	5,39E-01	2,41E-01
SD16-SD20 rev d2	8,82E-02	4,94E-02	-1,21E+00	4,70E-01	2,10E-01
SD21-SD25 wt d6	1,99E-02	6,90E-03	-1,73E+00	1,54E-01	6,88E-02
SD26-SD30 ko d6	3,25E-02	5,84E-03	-1,50E+00	7,59E-02	3,40E-02
SD31-SD35 rev d6	2,02E-02	1,09E-02	-1,78E+00	2,86E-01	1,28E-01

8.6.2 Rohdaten TaqMan-PCR CD200

Well Name	Threshold (dR)	Ct (dR)	Quantity (copies)	Quantity Avg. (copies)	-RT bereinigt	ratCD200/ cmyc	log ratCD200/ cmyc																																																																																																																																																																		
SD1 +RT rCD200	218,652	23,90	1,88E+04	1,84E+04	1,84E+04	0,130	0,887																																																																																																																																																																		
		23,96	1,80E+04					SD2 +RT rCD200	218,652	23,32	2,82E+04	3,12E+04	3,12E+04	0,366	0,436	23,04	3,42E+04	SD3 +RT rCD200	218,652	23,51	2,48E+04	2,34E+04	2,34E+04	0,148	0,831	23,68	2,19E+04	SD4 +RT rCD200	218,652	24,65	1,11E+04	1,13E+04	1,13E+04	0,066	1,180	24,61	1,15E+04	SD5 +RT rCD200	218,652	22,87	3,86E+04	4,07E+04	4,07E+04	1,301	0,114	22,72	4,27E+04	SD1 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD2 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD3 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD4 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				36,68	2,57E+00	SD5 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD6 +RT rCD200	119,742	23,79	2,04E+04	2,17E+04	2,17E+04	0,332	0,479	23,61	2,31E+04	SD7 +RT rCD200	119,742	23,47	2,53E+04	2,51E+04	2,51E+04	0,312	0,506	23,50	2,48E+04	SD8 +RT rCD200	119,742	24,30	1,42E+04	1,56E+04	1,56E+04	0,174	0,759	24,04	1,70E+04	SD9 +RT rCD200	119,742	22,78	4,10E+04	4,56E+04	4,56E+04	0,453	0,344	22,49	5,03E+04	SD10 +RT rCD200	119,742	22,04	6,85E+04	7,21E+04	7,21E+04	0,628	0,202	21,90	7,56E+04	SD6 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD7 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD8 -RT rCD200	119,742
SD2 +RT rCD200	218,652	23,32	2,82E+04	3,12E+04	3,12E+04	0,366	0,436																																																																																																																																																																		
		23,04	3,42E+04					SD3 +RT rCD200	218,652	23,51	2,48E+04	2,34E+04	2,34E+04	0,148	0,831	23,68	2,19E+04	SD4 +RT rCD200	218,652	24,65	1,11E+04	1,13E+04	1,13E+04	0,066	1,180	24,61	1,15E+04	SD5 +RT rCD200	218,652	22,87	3,86E+04	4,07E+04	4,07E+04	1,301	0,114	22,72	4,27E+04	SD1 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD2 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD3 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD4 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				36,68	2,57E+00	SD5 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD6 +RT rCD200	119,742	23,79	2,04E+04	2,17E+04	2,17E+04	0,332	0,479	23,61	2,31E+04	SD7 +RT rCD200	119,742	23,47	2,53E+04	2,51E+04	2,51E+04	0,312	0,506	23,50	2,48E+04	SD8 +RT rCD200	119,742	24,30	1,42E+04	1,56E+04	1,56E+04	0,174	0,759	24,04	1,70E+04	SD9 +RT rCD200	119,742	22,78	4,10E+04	4,56E+04	4,56E+04	0,453	0,344	22,49	5,03E+04	SD10 +RT rCD200	119,742	22,04	6,85E+04	7,21E+04	7,21E+04	0,628	0,202	21,90	7,56E+04	SD6 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD7 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD8 -RT rCD200	119,742	36,97	2,10E+00	No Ct							
SD3 +RT rCD200	218,652	23,51	2,48E+04	2,34E+04	2,34E+04	0,148	0,831																																																																																																																																																																		
		23,68	2,19E+04					SD4 +RT rCD200	218,652	24,65	1,11E+04	1,13E+04	1,13E+04	0,066	1,180	24,61	1,15E+04	SD5 +RT rCD200	218,652	22,87	3,86E+04	4,07E+04	4,07E+04	1,301	0,114	22,72	4,27E+04	SD1 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD2 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD3 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD4 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				36,68	2,57E+00	SD5 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD6 +RT rCD200	119,742	23,79	2,04E+04	2,17E+04	2,17E+04	0,332	0,479	23,61	2,31E+04	SD7 +RT rCD200	119,742	23,47	2,53E+04	2,51E+04	2,51E+04	0,312	0,506	23,50	2,48E+04	SD8 +RT rCD200	119,742	24,30	1,42E+04	1,56E+04	1,56E+04	0,174	0,759	24,04	1,70E+04	SD9 +RT rCD200	119,742	22,78	4,10E+04	4,56E+04	4,56E+04	0,453	0,344	22,49	5,03E+04	SD10 +RT rCD200	119,742	22,04	6,85E+04	7,21E+04	7,21E+04	0,628	0,202	21,90	7,56E+04	SD6 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD7 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD8 -RT rCD200	119,742	36,97	2,10E+00	No Ct																	
SD4 +RT rCD200	218,652	24,65	1,11E+04	1,13E+04	1,13E+04	0,066	1,180																																																																																																																																																																		
		24,61	1,15E+04					SD5 +RT rCD200	218,652	22,87	3,86E+04	4,07E+04	4,07E+04	1,301	0,114	22,72	4,27E+04	SD1 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD2 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD3 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD4 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				36,68	2,57E+00	SD5 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD6 +RT rCD200	119,742	23,79	2,04E+04	2,17E+04	2,17E+04	0,332	0,479	23,61	2,31E+04	SD7 +RT rCD200	119,742	23,47	2,53E+04	2,51E+04	2,51E+04	0,312	0,506	23,50	2,48E+04	SD8 +RT rCD200	119,742	24,30	1,42E+04	1,56E+04	1,56E+04	0,174	0,759	24,04	1,70E+04	SD9 +RT rCD200	119,742	22,78	4,10E+04	4,56E+04	4,56E+04	0,453	0,344	22,49	5,03E+04	SD10 +RT rCD200	119,742	22,04	6,85E+04	7,21E+04	7,21E+04	0,628	0,202	21,90	7,56E+04	SD6 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD7 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD8 -RT rCD200	119,742	36,97	2,10E+00	No Ct																											
SD5 +RT rCD200	218,652	22,87	3,86E+04	4,07E+04	4,07E+04	1,301	0,114																																																																																																																																																																		
		22,72	4,27E+04					SD1 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD2 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD3 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD4 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				36,68	2,57E+00	SD5 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD6 +RT rCD200	119,742	23,79	2,04E+04	2,17E+04	2,17E+04	0,332	0,479	23,61	2,31E+04	SD7 +RT rCD200	119,742	23,47	2,53E+04	2,51E+04	2,51E+04	0,312	0,506	23,50	2,48E+04	SD8 +RT rCD200	119,742	24,30	1,42E+04	1,56E+04	1,56E+04	0,174	0,759	24,04	1,70E+04	SD9 +RT rCD200	119,742	22,78	4,10E+04	4,56E+04	4,56E+04	0,453	0,344	22,49	5,03E+04	SD10 +RT rCD200	119,742	22,04	6,85E+04	7,21E+04	7,21E+04	0,628	0,202	21,90	7,56E+04	SD6 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD7 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD8 -RT rCD200	119,742	36,97	2,10E+00	No Ct																																					
SD1 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																					
		No Ct	No Ct					SD2 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD3 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD4 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				36,68	2,57E+00	SD5 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD6 +RT rCD200	119,742	23,79	2,04E+04	2,17E+04	2,17E+04	0,332	0,479	23,61	2,31E+04	SD7 +RT rCD200	119,742	23,47	2,53E+04	2,51E+04	2,51E+04	0,312	0,506	23,50	2,48E+04	SD8 +RT rCD200	119,742	24,30	1,42E+04	1,56E+04	1,56E+04	0,174	0,759	24,04	1,70E+04	SD9 +RT rCD200	119,742	22,78	4,10E+04	4,56E+04	4,56E+04	0,453	0,344	22,49	5,03E+04	SD10 +RT rCD200	119,742	22,04	6,85E+04	7,21E+04	7,21E+04	0,628	0,202	21,90	7,56E+04	SD6 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD7 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD8 -RT rCD200	119,742	36,97	2,10E+00	No Ct																																															
SD2 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																					
		No Ct	No Ct					SD3 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD4 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				36,68	2,57E+00	SD5 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD6 +RT rCD200	119,742	23,79	2,04E+04	2,17E+04	2,17E+04	0,332	0,479	23,61	2,31E+04	SD7 +RT rCD200	119,742	23,47	2,53E+04	2,51E+04	2,51E+04	0,312	0,506	23,50	2,48E+04	SD8 +RT rCD200	119,742	24,30	1,42E+04	1,56E+04	1,56E+04	0,174	0,759	24,04	1,70E+04	SD9 +RT rCD200	119,742	22,78	4,10E+04	4,56E+04	4,56E+04	0,453	0,344	22,49	5,03E+04	SD10 +RT rCD200	119,742	22,04	6,85E+04	7,21E+04	7,21E+04	0,628	0,202	21,90	7,56E+04	SD6 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD7 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD8 -RT rCD200	119,742	36,97	2,10E+00	No Ct																																																									
SD3 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																					
		No Ct	No Ct					SD4 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				36,68	2,57E+00	SD5 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD6 +RT rCD200	119,742	23,79	2,04E+04	2,17E+04	2,17E+04	0,332	0,479	23,61	2,31E+04	SD7 +RT rCD200	119,742	23,47	2,53E+04	2,51E+04	2,51E+04	0,312	0,506	23,50	2,48E+04	SD8 +RT rCD200	119,742	24,30	1,42E+04	1,56E+04	1,56E+04	0,174	0,759	24,04	1,70E+04	SD9 +RT rCD200	119,742	22,78	4,10E+04	4,56E+04	4,56E+04	0,453	0,344	22,49	5,03E+04	SD10 +RT rCD200	119,742	22,04	6,85E+04	7,21E+04	7,21E+04	0,628	0,202	21,90	7,56E+04	SD6 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD7 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD8 -RT rCD200	119,742	36,97	2,10E+00	No Ct																																																																			
SD4 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																					
		36,68	2,57E+00					SD5 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD6 +RT rCD200	119,742	23,79	2,04E+04	2,17E+04	2,17E+04	0,332	0,479	23,61	2,31E+04	SD7 +RT rCD200	119,742	23,47	2,53E+04	2,51E+04	2,51E+04	0,312	0,506	23,50	2,48E+04	SD8 +RT rCD200	119,742	24,30	1,42E+04	1,56E+04	1,56E+04	0,174	0,759	24,04	1,70E+04	SD9 +RT rCD200	119,742	22,78	4,10E+04	4,56E+04	4,56E+04	0,453	0,344	22,49	5,03E+04	SD10 +RT rCD200	119,742	22,04	6,85E+04	7,21E+04	7,21E+04	0,628	0,202	21,90	7,56E+04	SD6 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD7 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD8 -RT rCD200	119,742	36,97	2,10E+00	No Ct																																																																													
SD5 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																					
		No Ct	No Ct					SD6 +RT rCD200	119,742	23,79	2,04E+04	2,17E+04	2,17E+04	0,332	0,479	23,61	2,31E+04	SD7 +RT rCD200	119,742	23,47	2,53E+04	2,51E+04	2,51E+04	0,312	0,506	23,50	2,48E+04	SD8 +RT rCD200	119,742	24,30	1,42E+04	1,56E+04	1,56E+04	0,174	0,759	24,04	1,70E+04	SD9 +RT rCD200	119,742	22,78	4,10E+04	4,56E+04	4,56E+04	0,453	0,344	22,49	5,03E+04	SD10 +RT rCD200	119,742	22,04	6,85E+04	7,21E+04	7,21E+04	0,628	0,202	21,90	7,56E+04	SD6 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD7 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD8 -RT rCD200	119,742	36,97	2,10E+00	No Ct																																																																																							
SD6 +RT rCD200	119,742	23,79	2,04E+04	2,17E+04	2,17E+04	0,332	0,479																																																																																																																																																																		
		23,61	2,31E+04					SD7 +RT rCD200	119,742	23,47	2,53E+04	2,51E+04	2,51E+04	0,312	0,506	23,50	2,48E+04	SD8 +RT rCD200	119,742	24,30	1,42E+04	1,56E+04	1,56E+04	0,174	0,759	24,04	1,70E+04	SD9 +RT rCD200	119,742	22,78	4,10E+04	4,56E+04	4,56E+04	0,453	0,344	22,49	5,03E+04	SD10 +RT rCD200	119,742	22,04	6,85E+04	7,21E+04	7,21E+04	0,628	0,202	21,90	7,56E+04	SD6 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD7 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD8 -RT rCD200	119,742	36,97	2,10E+00	No Ct																																																																																																	
SD7 +RT rCD200	119,742	23,47	2,53E+04	2,51E+04	2,51E+04	0,312	0,506																																																																																																																																																																		
		23,50	2,48E+04					SD8 +RT rCD200	119,742	24,30	1,42E+04	1,56E+04	1,56E+04	0,174	0,759	24,04	1,70E+04	SD9 +RT rCD200	119,742	22,78	4,10E+04	4,56E+04	4,56E+04	0,453	0,344	22,49	5,03E+04	SD10 +RT rCD200	119,742	22,04	6,85E+04	7,21E+04	7,21E+04	0,628	0,202	21,90	7,56E+04	SD6 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD7 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD8 -RT rCD200	119,742	36,97	2,10E+00	No Ct																																																																																																											
SD8 +RT rCD200	119,742	24,30	1,42E+04	1,56E+04	1,56E+04	0,174	0,759																																																																																																																																																																		
		24,04	1,70E+04					SD9 +RT rCD200	119,742	22,78	4,10E+04	4,56E+04	4,56E+04	0,453	0,344	22,49	5,03E+04	SD10 +RT rCD200	119,742	22,04	6,85E+04	7,21E+04	7,21E+04	0,628	0,202	21,90	7,56E+04	SD6 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD7 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD8 -RT rCD200	119,742	36,97	2,10E+00	No Ct																																																																																																																					
SD9 +RT rCD200	119,742	22,78	4,10E+04	4,56E+04	4,56E+04	0,453	0,344																																																																																																																																																																		
		22,49	5,03E+04					SD10 +RT rCD200	119,742	22,04	6,85E+04	7,21E+04	7,21E+04	0,628	0,202	21,90	7,56E+04	SD6 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD7 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD8 -RT rCD200	119,742	36,97	2,10E+00	No Ct																																																																																																																															
SD10 +RT rCD200	119,742	22,04	6,85E+04	7,21E+04	7,21E+04	0,628	0,202																																																																																																																																																																		
		21,90	7,56E+04					SD6 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD7 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD8 -RT rCD200	119,742	36,97	2,10E+00	No Ct																																																																																																																																									
SD6 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																					
		No Ct	No Ct					SD7 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD8 -RT rCD200	119,742	36,97	2,10E+00	No Ct																																																																																																																																																			
SD7 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																					
		No Ct	No Ct					SD8 -RT rCD200	119,742	36,97	2,10E+00	No Ct																																																																																																																																																													
SD8 -RT rCD200	119,742	36,97	2,10E+00	No Ct																																																																																																																																																																					

		No Ct	No Ct				
SD9 -RT rCD200	119,742	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD10 -RT rCD200	119,742	36,68	2,58E+00	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD11 spleen +RT	121,17	22,73	4,25E+04	3,18E+04	3,18E+04	0,476	0,322
		23,74	2,10E+04				
SD12 Spleen +RT	121,17	21,76	8,34E+04	6,74E+04	6,74E+04	1,174	0,070
		22,46	5,13E+04				
SD13 spleen +RT	121,17	22,46	5,12E+04	4,81E+04	4,81E+04	0,718	0,144
		22,65	4,49E+04				
SD14 spleen +RT	121,17	23,06	3,39E+04	2,94E+04	2,94E+04	0,281	0,552
		23,50	2,49E+04				
SD15 spleen +RT	121,17	22,44	5,19E+04	4,83E+04	4,83E+04	1,504	0,177
		22,66	4,47E+04				
SD11 spleen -RT	121,17	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD12 spleen -RT	121,17	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD13 spleen -RT	121,17	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD14 spleen -RT	121,17	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD15 spleen -RT				No Ct			
SD16 +RT ratCD200	123,152	21,04	1,38E+05	1,28E+05	1,28E+05	3,278	0,516
		21,26	1,19E+05				
SD17 +RT rat CD200	123,152	21,41	1,06E+05	9,74E+04	9,74E+04	1,670	0,223
		21,68	8,84E+04				
SD18 +RT rCD200	123,152	22,46	5,12E+04	4,62E+04	4,62E+04	0,578	0,238
		22,77	4,12E+04				
SD19 +RT rCD200	123,152	21,62	9,21E+04	8,88E+04	8,88E+04	1,230	0,090
		21,72	8,55E+04				
SD20 +RT rCD200	123,152	21,20	1,23E+05	1,14E+05	1,14E+05	1,815	0,259
		21,45	1,04E+05				
SD16 -RT rCD200	123,152	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD17 -RT rCD200	123,152	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD18 -RT rCD200	123,152	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD19 -RT rCD200	123,152	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD20 -RT rCD200	123,152	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD21 +RT rCD200	218,652	23,28	2,90E+04	3,06E+04	3,06E+04	0,540	0,268
		23,13	3,23E+04				
SD22 +RT rCD200	218,652	22,79	4,07E+04	2,73E+04	2,73E+04	0,841	0,075
		24,33	1,39E+04				
SD23 +RT rCD200	218,652	23,82	1,99E+04	1,79E+04	1,79E+04	0,150	0,824
		24,13	1,60E+04				
SD24 +RT rCD200	218,652	22,26	5,89E+04	5,24E+04	5,24E+04	0,406	0,392
		22,62	4,59E+04				
SD25 +RT rCD200	218,652	22,54	4,84E+04	4,24E+04	4,24E+04	0,945	0,024
		22,95	3,64E+04				
SD21 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				

SD22 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD23 -RT rCD200	218,652	36,30	3,36E+00	3,36E+00			
		No Ct	No Ct				
SD24 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD25 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD26 +RT rCD200	218,652	23,26	2,93E+04	2,80E+04	2,80E+04	2,229	0,348
		23,40	2,66E+04				
SD27 +RT rCD200	218,652	22,64	4,51E+04	3,56E+04	3,56E+04	4,252	0,629
		23,43	2,62E+04				
SD28 +RT rCD200	218,652	23,17	3,12E+04	2,93E+04	2,93E+04	2,023	0,306
		23,36	2,74E+04				
SD29 +RT rCD200	218,652	22,39	5,38E+04	4,68E+04	4,68E+04	1,237	0,093
		22,83	3,97E+04				
SD30 +RT rCD200	218,652	23,21	3,04E+04	3,08E+04	3,08E+04	0,171	0,766
		23,17	3,13E+04				
SD26 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD27 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD28 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD29 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD30 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD31 +RT rCD200	218,652	20,82	1,61E+05	1,18E+05	1,18E+05	5,656	0,752
		21,90	7,55E+04				
SD32 +RT rCD200	218,652	21,60	9,32E+04	6,91E+04	6,91E+04	1,491	0,173
		22,65	4,50E+04				
SD33 +RT rCD200	218,652	23,14	3,19E+04	3,61E+04	3,61E+04	2,918	0,465
		22,80	4,03E+04				
SD34 +RT rCD200	218,652	20,91	1,50E+05	1,27E+05	1,27E+05	3,011	0,479
		21,44	1,04E+05				
SD35 +RT rCD200	218,652	22,83	3,96E+04	4,93E+04	4,93E+04	7,744	0,889
		22,26	5,91E+04				
SD31 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD32 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD33 -RT rCD200	218,652	38,90	5,50E-01	1,40E+00			
		36,88	2,25E+00				
SD34 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD35 -RT rCD200	218,652	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				

Goup	mean value rat Cd200/cm _{yc}	standard deviation	mittelwert log10 (rat Cd200/cm _{yc})	Stabwn log10 rCD200/cm _{yc}	Stabwn log10 (rCD200/cm _{yc})/Wurzel(n)
SD1-SD5 mock	4,02E-01	4,61E-01	-6,44E-01	4,47E-01	8,94E-02
SD6-SD10 wt d2	3,80E-01	1,52E-01	-4,58E-01	1,85E-01	8,29E-02

SD11-SD15 ko d2	8,30E-01	4,50E-01	-1,54E-01	2,63E-01	1,18E-01
SD16-SD20 rev d2	1,71E+00	8,92E-01	#DIV/0!	2,46E-01	1,10E-01
SD21-SD25 wt d6	5,76E-01	2,89E-01	-3,17E-01	2,86E-01	1,28E-01
SD26-SD30 ko d6	1,98E+00	1,35E+00	1,22E-01	4,76E-01	2,13E-01
SD31-SD35 rev d6	4,16E+00	2,24E+00	5,52E-01	2,49E-01	1,11E-01

8.6.3 Rohdaten TaqMan-PCR vCD200

Well Name	Threshold (dR)	Ct (dR)	Quantity (copies)	Quantity Avg. (copies)	-RT bereinigt	vCD200/ cmyc	log vCD200/ cmyc
SD1spleen_vCD200+RT	1510,852	37,81	3,01E-01	3,01E-01	No Ct	No Ct	#NUM!
		No Ct	No Ct				
SD2spleen_vCD200+RT	1510,852	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	#NUM!
		No Ct	No Ct				
SD 3 +RT vCD200	1331,259	No Ct	<2 Unique FAM Standards	No Ct	No Ct	No Ct	#NUM!
		No Ct	<2 Unique FAM Standards				
SD 4 +RT vCD200	1331,259	No Ct	<2 Unique FAM Standards	No Ct	No Ct	No Ct	#NUM!
		No Ct	<2 Unique FAM Standards				
SD 5 +RT vCD200	1331,259	No Ct	<2 Unique FAM Standards	No Ct	No Ct	No Ct	#NUM!
		No Ct	<2 Unique FAM Standards				
SD1spleen_vCD200-RT	1510,852	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD2spleen_vCD200-RT	1510,852	39,53	8,94E-02	8,94E-02			
		No Ct	No Ct				
SD3spleen_vCD200-RT	1510,852	37,42	3,98E-01	3,98E-01			
		No Ct	No Ct				
SD4spleen_vCD200-RT	1510,852	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD5spleen_vCD200-RT	1510,852	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD6spleen_vCD200+RT	1510,852	32,84	1,01E+01	7,61E+00	7,61E+00	0,000	3,935
		33,81	5,12E+00				
SD7spleen_vCD200+RT	1510,852	35,06	2,11E+00	2,12E+00	2,12E+00	0,000	4,578
		35,05	2,13E+00				
SD8spleen_vCD200+RT	1510,852	41,69	1,94E-02	1,94E-02	7,30E-02	0,000	No Ct
		No Ct	No Ct				
SD9spleen_vCD200+RT	1510,852	33,53	6,23E+00	7,58E+00	7,58E+00	0,000	4,123
		33,02	8,92E+00				
SD10spleen_vCD200+RT	1510,852	33,11	8,39E+00	7,60E+00	7,60E+00	0,000	4,179
		33,40	6,81E+00				
SD6spleen_vCD200-RT	1510,852	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD7spleen_vCD200-RT	1510,852	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD8spleen_vCD200-RT	1510,852	39,31	1,04E-01	9,24E-02			
		39,68	8,04E-02				
SD9spleen_vCD200-RT	1510,852	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD10spleen_vCD200-RT	1510,852	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				

SD11spleen_vCD200+RT	1510,852	39,38	9,91E-02	9,91E-02	9,91E-02	0,000	No Ct
		No Ct	No Ct				
SD12spleen_vCD200+RT	1510,852	38,05	2,55E-01	4,17E-01	4,17E-01	0,000	No Ct
		36,89	5,79E-01				
SD13spleen_vCD200+RT	1510,852	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
		No Ct	No Ct				
SD14spleen_vCD200+RT	1510,852	39,62	8,39E-02	8,39E-02	8,39E-02	0,000	No Ct
		No Ct	No Ct				
SD15spleen_vCD200+RT	1510,852	39,81	7,34E-02	7,34E-02	7,34E-02	0,000	No Ct
		No Ct	No Ct				
SD11spleen_vCD200-RT	1510,852	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD12spleen_vCD200-RT	1510,852	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD13spleen_vCD200-RT	1510,852	No Ct	No Ct	No Ct			
		37,99	2,65E-01				
SD14spleen_vCD200-RT	1510,852	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD15spleen_vCD200-RT	1510,852	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD16spleen_vCD200+RT	1982,546	38,71	1,59E-01	2,12E-01	2,12E-01	0,000	5,265
		37,99	2,66E-01				
SD17spleen_vCD200+RT	1982,546	36,81	6,10E-01	8,34E-01	8,34E-01	0,000	4,845
		36,03	1,06E+00				
SD18spleen_vCD200+RT	1982,546	No Ct	No Ct	No Ct	9,36E-02	0,000	No Ct
		No Ct	No Ct				
SD19spleen_vCD200+RT	1982,546	35,69	1,35E+00	1,06E+00	9,19E-01	0,000	4,895
		36,47	7,75E-01				
SD20spleen_vCD200+RT	1982,546	32,63	1,18E+01	1,17E+01	1,16E+01	0,000	3,731
		32,64	1,17E+01				
SD16spleen_vCD200-RT	1982,546	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD17spleen_vCD200-RT	1982,546	No Ct	No Ct	No Ct			
		39,97	6,54E-02				
SD18spleen_vCD200-RT	1982,546	39,46	9,36E-02	9,36E-02			
		No Ct	No Ct				
SD19spleen_vCD200-RT	1982,546	38,14	2,38E-01	1,41E-01			
		40,53	4,40E-02				
SD20spleen_vCD200-RT	1982,546	38,61	1,71E-01	8,84E-02			
		43,44	5,61E-03				
SD21spleen_vCD200+RT	1982,546	39,26	1,08E-01	3,37E-01	3,37E-01	0,000	5,227
		36,92	5,65E-01				
SD22spleen_vCD200+RT	1982,546	36,29	8,86E-01	1,27E+00	1,07E+00	0,000	4,483
		35,40	1,66E+00				
SD23spleen_vCD200+RT	1982,546	33,57	6,06E+00	5,43E+00	5,31E+00	0,000	4,353
		33,90	4,79E+00				
SD24spleen_vCD200+RT	1982,546	36,33	8,56E-01	7,76E-01	7,76E-01	0,000	5,221
		36,63	6,96E-01				
SD25spleen_vCD200+RT	1982,546	37,27	4,41E-01	8,64E-01	8,64E-01	0,000	4,715
		35,76	1,29E+00				
SD21spleen_vCD200-RT	1982,546	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD22spleen_vCD200-RT	1982,546	38,96	1,34E-01	2,02E-01			
		37,96	2,70E-01				
SD23spleen_vCD200-RT	1982,546	39,13	1,18E-01	1,18E-01			
		No Ct	No Ct				
SD24spleen_vCD200-RT	1982,546	No Ct	No Ct	No Ct			

		No Ct	No Ct				
SD25spleen_vCD200-RT	1982,546	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
		No Ct	No Ct				
SD26spleen_vCD200+RT	1982,546	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
		No Ct	No Ct				
		No Ct	No Ct				
SD27spleen_vCD200+RT	1982,546	39,92	6,76E-02	4,42E-02	4,42E-02	0,000	5,278
		41,60	2,07E-02				
		No Ct	No Ct				
SD28spleen_vCD200+RT	1982,546	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
		No Ct	No Ct				
		No Ct	No Ct				
SD29spleen_vCD200+RT	1982,546	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
		39,43	9,59E-02				
		No Ct	No Ct				
SD30spleen_vCD200+RT	1982,546	41,09	2,96E-02	4,03E-02	4,03E-02	0,000	6,650
		40,32	5,10E-02				
		No Ct	No Ct				
SD26spleen_vCD200-RT	1982,546	No Ct	No Ct	No Ct			
		40,05	6,20E-02				
		No Ct	No Ct				
SD27spleen_vCD200-RT	1982,546	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
		No Ct	No Ct				
SD28spleen_vCD200-RT	1982,546	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
		No Ct	No Ct				
SD29spleen_vCD200-RT	1982,546	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
		No Ct	No Ct				
SD30-RT	1478,313	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
		No Ct	No Ct				
SD31spleen_vCD200+RT	1376,904	35,51	1,53E+00	1,13E+00	1,05E+00	0,000	4,299
		36,56	7,28E-01				
		No Ct	No Ct				
SD32spleen_vCD200+RT	1376,904	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
		No Ct	No Ct				
		No Ct	No Ct				
SD33spleen_vCD200+RT	1376,904	35,13	2,01E+00	1,44E+00	1,44E+00	0,000	3,934
		36,32	8,64E-01				
		No Ct	No Ct				
SD34spleen_vCD200+RT	1376,904	35,83	1,22E+00	1,27E+00	1,27E+00	0,000	4,522
		35,72	1,33E+00				
		No Ct	No Ct				
SD35spleen_vCD200+RT	1376,904	40,03	6,27E-02	5,96E-02	5,96E-02	0,000	5,029
		40,18	5,66E-02				
		No Ct	No Ct				
SD31spleen_vCD200-RT	1376,904	39,68	8,01E-02	8,01E-02			
		No Ct	No Ct				
		No Ct	No Ct				
SD32spleen_vCD200-RT	1376,904	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
		No Ct	No Ct				
SD33spleen_vCD200-RT	1376,904	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
		No Ct	No Ct				
SD34spleen_vCD200-RT	1376,904	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
		No Ct	No Ct				
SD35spleen_vCD200-RT	1376,904	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
		No Ct	No Ct				

Goup	mean value vCD200/cmyc	standard deviation	mittelwert log10 (vCD200/cmyc)	Stabwn log10 vCD200/cmyc	Stabwn log10 (vCD200/cmyc)/Wurzel(n)
SD1-SD5 mock	0,00E+00	0,00E+00	-7,00E+00	#NUM!	#NUM!
SD6-SD10 wt d2	5,67E-05	4,05E-05	-3,36E+00	1,69E+00	7,58E-01
SD11-SD15 ko d2	2,37E-06	2,56E-06	-7,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
SD16-SD20 rev d2	4,35E-05	7,15E-05	-4,68E+00	5,74E-01	2,57E-01
SD21-SD25 wt d6	2,17E-05	1,51E-05	-4,80E+00	3,65E-01	1,63E-01
SD26-SD30 ko d6	1,10E-06	2,09E-06	-7,00E+00		0,00E+00
SD31-SD35 rev d6	4,12E-05	4,14E-05	-3,56E+00	1,81E+00	8,11E-01

8.6.4 Rohdaten TaqMan-PCR CD200R

Well Name	Threshold (dR)	Ct (dR)	Quantity (copies)	Quantity Avg. (copies)	-RT bereinigt	CD200R/ cmyc	log CD200R/ cmyc																																																																																																																																																																																																																																																		
SD1 +RT CD200R	1325,219	33,84	4,89E+02	5,29E+02	5,29E+02	0,004	2,429																																																																																																																																																																																																																																																		
		33,62	5,69E+02					SD2 +RT CD200R	1325,219	32,22	1,53E+03	1,67E+03	1,66E+03	0,020	1,709	31,99	1,80E+03	SD3 +RT CD200R	1325,219	33,04	8,58E+02	9,34E+02	9,29E+02	0,006	2,231	32,81	1,01E+03	SD4 +RT CD200R	1325,219	31,75	2,13E+03	1,97E+03	1,93E+03	0,011	1,948	31,98	1,81E+03	SD5 +RT CD200R	1325,219	34,40	3,27E+02	5,44E+02	5,44E+02	0,017	1,759	33,21	7,62E+02	SD1 -RT CD200R	1325,219	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD2 -RT CD200R	1325,219	42,46	1,10E+00	1,10E+00				No Ct	No Ct	SD3 -RT CD200R	1325,219	40,36	4,85E+00	4,85E+00				No Ct	No Ct	SD4 -RT CD200R	1325,219	39,21	1,10E+01	4,14E+01				36,55	7,18E+01	SD5 -RT CD200R	1325,219	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD6 +RT CD200R	982,376	27,49	4,32E+04	4,27E+04	4,27E+04	0,652	0,186	27,52	4,23E+04	SD7 +RT CD200R	982,376	26,24	1,05E+05	9,88E+04	9,88E+04	1,230	0,090	26,41	9,27E+04	SD8 +RT CD200R	982,376	30,99	3,66E+03	2,96E+03	2,96E+03	0,033	1,482	31,67	2,26E+03	SD9 +RT CD200R	982,376	26,65	7,85E+04	7,91E+04	7,91E+04	0,786	0,105	26,62	7,97E+04	SD10+RT CD200R	982,376	27,45	4,46E+04	4,98E+04	4,98E+04	0,434	0,362	27,15	5,50E+04	SD6 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD7 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				35,69	1,32E+02	SD8 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD9 -RT CD200R	982,376	38,37	1,98E+01	1,01E+01				44,30	3,00E-01	SD10 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD11+RT CD200R	1325,219	29,10	1,39E+04	1,19E+04	1,19E+04	0,178	0,750	29,59	9,83E+03	SD12+RT CD200R	1325,219	28,61	1,96E+04	1,88E+04	1,88E+04	0,328	0,485	28,73	1,79E+04	SD13+RT CD200R	1325,219	31,25	3,04E+03	2,41E+03	2,41E+03	0,036	1,443	32,00	1,78E+03	SD14+RT CD200R	1325,219	27,85	3,36E+04	3,13E+04	3,13E+04	0,299	0,525	28,06	2,90E+04	SD15+RT CD200R	1325,219	32,36	1,39E+03	1,46E+03	1,46E+03	0,045	1,343	32,22	1,53E+03	SD11 -RT CD200R	1325,219
SD2 +RT CD200R	1325,219	32,22	1,53E+03	1,67E+03	1,66E+03	0,020	1,709																																																																																																																																																																																																																																																		
		31,99	1,80E+03					SD3 +RT CD200R	1325,219	33,04	8,58E+02	9,34E+02	9,29E+02	0,006	2,231	32,81	1,01E+03	SD4 +RT CD200R	1325,219	31,75	2,13E+03	1,97E+03	1,93E+03	0,011	1,948	31,98	1,81E+03	SD5 +RT CD200R	1325,219	34,40	3,27E+02	5,44E+02	5,44E+02	0,017	1,759	33,21	7,62E+02	SD1 -RT CD200R	1325,219	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD2 -RT CD200R	1325,219	42,46	1,10E+00	1,10E+00				No Ct	No Ct	SD3 -RT CD200R	1325,219	40,36	4,85E+00	4,85E+00				No Ct	No Ct	SD4 -RT CD200R	1325,219	39,21	1,10E+01	4,14E+01				36,55	7,18E+01	SD5 -RT CD200R	1325,219	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD6 +RT CD200R	982,376	27,49	4,32E+04	4,27E+04	4,27E+04	0,652	0,186	27,52	4,23E+04	SD7 +RT CD200R	982,376	26,24	1,05E+05	9,88E+04	9,88E+04	1,230	0,090	26,41	9,27E+04	SD8 +RT CD200R	982,376	30,99	3,66E+03	2,96E+03	2,96E+03	0,033	1,482	31,67	2,26E+03	SD9 +RT CD200R	982,376	26,65	7,85E+04	7,91E+04	7,91E+04	0,786	0,105	26,62	7,97E+04	SD10+RT CD200R	982,376	27,45	4,46E+04	4,98E+04	4,98E+04	0,434	0,362	27,15	5,50E+04	SD6 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD7 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				35,69	1,32E+02	SD8 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD9 -RT CD200R	982,376	38,37	1,98E+01	1,01E+01				44,30	3,00E-01	SD10 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD11+RT CD200R	1325,219	29,10	1,39E+04	1,19E+04	1,19E+04	0,178	0,750	29,59	9,83E+03	SD12+RT CD200R	1325,219	28,61	1,96E+04	1,88E+04	1,88E+04	0,328	0,485	28,73	1,79E+04	SD13+RT CD200R	1325,219	31,25	3,04E+03	2,41E+03	2,41E+03	0,036	1,443	32,00	1,78E+03	SD14+RT CD200R	1325,219	27,85	3,36E+04	3,13E+04	3,13E+04	0,299	0,525	28,06	2,90E+04	SD15+RT CD200R	1325,219	32,36	1,39E+03	1,46E+03	1,46E+03	0,045	1,343	32,22	1,53E+03	SD11 -RT CD200R	1325,219	43,47	5,40E-01	5,40E-01							
SD3 +RT CD200R	1325,219	33,04	8,58E+02	9,34E+02	9,29E+02	0,006	2,231																																																																																																																																																																																																																																																		
		32,81	1,01E+03					SD4 +RT CD200R	1325,219	31,75	2,13E+03	1,97E+03	1,93E+03	0,011	1,948	31,98	1,81E+03	SD5 +RT CD200R	1325,219	34,40	3,27E+02	5,44E+02	5,44E+02	0,017	1,759	33,21	7,62E+02	SD1 -RT CD200R	1325,219	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD2 -RT CD200R	1325,219	42,46	1,10E+00	1,10E+00				No Ct	No Ct	SD3 -RT CD200R	1325,219	40,36	4,85E+00	4,85E+00				No Ct	No Ct	SD4 -RT CD200R	1325,219	39,21	1,10E+01	4,14E+01				36,55	7,18E+01	SD5 -RT CD200R	1325,219	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD6 +RT CD200R	982,376	27,49	4,32E+04	4,27E+04	4,27E+04	0,652	0,186	27,52	4,23E+04	SD7 +RT CD200R	982,376	26,24	1,05E+05	9,88E+04	9,88E+04	1,230	0,090	26,41	9,27E+04	SD8 +RT CD200R	982,376	30,99	3,66E+03	2,96E+03	2,96E+03	0,033	1,482	31,67	2,26E+03	SD9 +RT CD200R	982,376	26,65	7,85E+04	7,91E+04	7,91E+04	0,786	0,105	26,62	7,97E+04	SD10+RT CD200R	982,376	27,45	4,46E+04	4,98E+04	4,98E+04	0,434	0,362	27,15	5,50E+04	SD6 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD7 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				35,69	1,32E+02	SD8 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD9 -RT CD200R	982,376	38,37	1,98E+01	1,01E+01				44,30	3,00E-01	SD10 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD11+RT CD200R	1325,219	29,10	1,39E+04	1,19E+04	1,19E+04	0,178	0,750	29,59	9,83E+03	SD12+RT CD200R	1325,219	28,61	1,96E+04	1,88E+04	1,88E+04	0,328	0,485	28,73	1,79E+04	SD13+RT CD200R	1325,219	31,25	3,04E+03	2,41E+03	2,41E+03	0,036	1,443	32,00	1,78E+03	SD14+RT CD200R	1325,219	27,85	3,36E+04	3,13E+04	3,13E+04	0,299	0,525	28,06	2,90E+04	SD15+RT CD200R	1325,219	32,36	1,39E+03	1,46E+03	1,46E+03	0,045	1,343	32,22	1,53E+03	SD11 -RT CD200R	1325,219	43,47	5,40E-01	5,40E-01																	
SD4 +RT CD200R	1325,219	31,75	2,13E+03	1,97E+03	1,93E+03	0,011	1,948																																																																																																																																																																																																																																																		
		31,98	1,81E+03					SD5 +RT CD200R	1325,219	34,40	3,27E+02	5,44E+02	5,44E+02	0,017	1,759	33,21	7,62E+02	SD1 -RT CD200R	1325,219	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD2 -RT CD200R	1325,219	42,46	1,10E+00	1,10E+00				No Ct	No Ct	SD3 -RT CD200R	1325,219	40,36	4,85E+00	4,85E+00				No Ct	No Ct	SD4 -RT CD200R	1325,219	39,21	1,10E+01	4,14E+01				36,55	7,18E+01	SD5 -RT CD200R	1325,219	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD6 +RT CD200R	982,376	27,49	4,32E+04	4,27E+04	4,27E+04	0,652	0,186	27,52	4,23E+04	SD7 +RT CD200R	982,376	26,24	1,05E+05	9,88E+04	9,88E+04	1,230	0,090	26,41	9,27E+04	SD8 +RT CD200R	982,376	30,99	3,66E+03	2,96E+03	2,96E+03	0,033	1,482	31,67	2,26E+03	SD9 +RT CD200R	982,376	26,65	7,85E+04	7,91E+04	7,91E+04	0,786	0,105	26,62	7,97E+04	SD10+RT CD200R	982,376	27,45	4,46E+04	4,98E+04	4,98E+04	0,434	0,362	27,15	5,50E+04	SD6 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD7 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				35,69	1,32E+02	SD8 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD9 -RT CD200R	982,376	38,37	1,98E+01	1,01E+01				44,30	3,00E-01	SD10 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD11+RT CD200R	1325,219	29,10	1,39E+04	1,19E+04	1,19E+04	0,178	0,750	29,59	9,83E+03	SD12+RT CD200R	1325,219	28,61	1,96E+04	1,88E+04	1,88E+04	0,328	0,485	28,73	1,79E+04	SD13+RT CD200R	1325,219	31,25	3,04E+03	2,41E+03	2,41E+03	0,036	1,443	32,00	1,78E+03	SD14+RT CD200R	1325,219	27,85	3,36E+04	3,13E+04	3,13E+04	0,299	0,525	28,06	2,90E+04	SD15+RT CD200R	1325,219	32,36	1,39E+03	1,46E+03	1,46E+03	0,045	1,343	32,22	1,53E+03	SD11 -RT CD200R	1325,219	43,47	5,40E-01	5,40E-01																											
SD5 +RT CD200R	1325,219	34,40	3,27E+02	5,44E+02	5,44E+02	0,017	1,759																																																																																																																																																																																																																																																		
		33,21	7,62E+02					SD1 -RT CD200R	1325,219	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD2 -RT CD200R	1325,219	42,46	1,10E+00	1,10E+00				No Ct	No Ct	SD3 -RT CD200R	1325,219	40,36	4,85E+00	4,85E+00				No Ct	No Ct	SD4 -RT CD200R	1325,219	39,21	1,10E+01	4,14E+01				36,55	7,18E+01	SD5 -RT CD200R	1325,219	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD6 +RT CD200R	982,376	27,49	4,32E+04	4,27E+04	4,27E+04	0,652	0,186	27,52	4,23E+04	SD7 +RT CD200R	982,376	26,24	1,05E+05	9,88E+04	9,88E+04	1,230	0,090	26,41	9,27E+04	SD8 +RT CD200R	982,376	30,99	3,66E+03	2,96E+03	2,96E+03	0,033	1,482	31,67	2,26E+03	SD9 +RT CD200R	982,376	26,65	7,85E+04	7,91E+04	7,91E+04	0,786	0,105	26,62	7,97E+04	SD10+RT CD200R	982,376	27,45	4,46E+04	4,98E+04	4,98E+04	0,434	0,362	27,15	5,50E+04	SD6 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD7 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				35,69	1,32E+02	SD8 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD9 -RT CD200R	982,376	38,37	1,98E+01	1,01E+01				44,30	3,00E-01	SD10 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD11+RT CD200R	1325,219	29,10	1,39E+04	1,19E+04	1,19E+04	0,178	0,750	29,59	9,83E+03	SD12+RT CD200R	1325,219	28,61	1,96E+04	1,88E+04	1,88E+04	0,328	0,485	28,73	1,79E+04	SD13+RT CD200R	1325,219	31,25	3,04E+03	2,41E+03	2,41E+03	0,036	1,443	32,00	1,78E+03	SD14+RT CD200R	1325,219	27,85	3,36E+04	3,13E+04	3,13E+04	0,299	0,525	28,06	2,90E+04	SD15+RT CD200R	1325,219	32,36	1,39E+03	1,46E+03	1,46E+03	0,045	1,343	32,22	1,53E+03	SD11 -RT CD200R	1325,219	43,47	5,40E-01	5,40E-01																																					
SD1 -RT CD200R	1325,219	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																																																																																																					
		No Ct	No Ct					SD2 -RT CD200R	1325,219	42,46	1,10E+00	1,10E+00				No Ct	No Ct	SD3 -RT CD200R	1325,219	40,36	4,85E+00	4,85E+00				No Ct	No Ct	SD4 -RT CD200R	1325,219	39,21	1,10E+01	4,14E+01				36,55	7,18E+01	SD5 -RT CD200R	1325,219	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD6 +RT CD200R	982,376	27,49	4,32E+04	4,27E+04	4,27E+04	0,652	0,186	27,52	4,23E+04	SD7 +RT CD200R	982,376	26,24	1,05E+05	9,88E+04	9,88E+04	1,230	0,090	26,41	9,27E+04	SD8 +RT CD200R	982,376	30,99	3,66E+03	2,96E+03	2,96E+03	0,033	1,482	31,67	2,26E+03	SD9 +RT CD200R	982,376	26,65	7,85E+04	7,91E+04	7,91E+04	0,786	0,105	26,62	7,97E+04	SD10+RT CD200R	982,376	27,45	4,46E+04	4,98E+04	4,98E+04	0,434	0,362	27,15	5,50E+04	SD6 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD7 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				35,69	1,32E+02	SD8 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD9 -RT CD200R	982,376	38,37	1,98E+01	1,01E+01				44,30	3,00E-01	SD10 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD11+RT CD200R	1325,219	29,10	1,39E+04	1,19E+04	1,19E+04	0,178	0,750	29,59	9,83E+03	SD12+RT CD200R	1325,219	28,61	1,96E+04	1,88E+04	1,88E+04	0,328	0,485	28,73	1,79E+04	SD13+RT CD200R	1325,219	31,25	3,04E+03	2,41E+03	2,41E+03	0,036	1,443	32,00	1,78E+03	SD14+RT CD200R	1325,219	27,85	3,36E+04	3,13E+04	3,13E+04	0,299	0,525	28,06	2,90E+04	SD15+RT CD200R	1325,219	32,36	1,39E+03	1,46E+03	1,46E+03	0,045	1,343	32,22	1,53E+03	SD11 -RT CD200R	1325,219	43,47	5,40E-01	5,40E-01																																															
SD2 -RT CD200R	1325,219	42,46	1,10E+00	1,10E+00																																																																																																																																																																																																																																																					
		No Ct	No Ct					SD3 -RT CD200R	1325,219	40,36	4,85E+00	4,85E+00				No Ct	No Ct	SD4 -RT CD200R	1325,219	39,21	1,10E+01	4,14E+01				36,55	7,18E+01	SD5 -RT CD200R	1325,219	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD6 +RT CD200R	982,376	27,49	4,32E+04	4,27E+04	4,27E+04	0,652	0,186	27,52	4,23E+04	SD7 +RT CD200R	982,376	26,24	1,05E+05	9,88E+04	9,88E+04	1,230	0,090	26,41	9,27E+04	SD8 +RT CD200R	982,376	30,99	3,66E+03	2,96E+03	2,96E+03	0,033	1,482	31,67	2,26E+03	SD9 +RT CD200R	982,376	26,65	7,85E+04	7,91E+04	7,91E+04	0,786	0,105	26,62	7,97E+04	SD10+RT CD200R	982,376	27,45	4,46E+04	4,98E+04	4,98E+04	0,434	0,362	27,15	5,50E+04	SD6 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD7 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				35,69	1,32E+02	SD8 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD9 -RT CD200R	982,376	38,37	1,98E+01	1,01E+01				44,30	3,00E-01	SD10 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD11+RT CD200R	1325,219	29,10	1,39E+04	1,19E+04	1,19E+04	0,178	0,750	29,59	9,83E+03	SD12+RT CD200R	1325,219	28,61	1,96E+04	1,88E+04	1,88E+04	0,328	0,485	28,73	1,79E+04	SD13+RT CD200R	1325,219	31,25	3,04E+03	2,41E+03	2,41E+03	0,036	1,443	32,00	1,78E+03	SD14+RT CD200R	1325,219	27,85	3,36E+04	3,13E+04	3,13E+04	0,299	0,525	28,06	2,90E+04	SD15+RT CD200R	1325,219	32,36	1,39E+03	1,46E+03	1,46E+03	0,045	1,343	32,22	1,53E+03	SD11 -RT CD200R	1325,219	43,47	5,40E-01	5,40E-01																																																									
SD3 -RT CD200R	1325,219	40,36	4,85E+00	4,85E+00																																																																																																																																																																																																																																																					
		No Ct	No Ct					SD4 -RT CD200R	1325,219	39,21	1,10E+01	4,14E+01				36,55	7,18E+01	SD5 -RT CD200R	1325,219	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD6 +RT CD200R	982,376	27,49	4,32E+04	4,27E+04	4,27E+04	0,652	0,186	27,52	4,23E+04	SD7 +RT CD200R	982,376	26,24	1,05E+05	9,88E+04	9,88E+04	1,230	0,090	26,41	9,27E+04	SD8 +RT CD200R	982,376	30,99	3,66E+03	2,96E+03	2,96E+03	0,033	1,482	31,67	2,26E+03	SD9 +RT CD200R	982,376	26,65	7,85E+04	7,91E+04	7,91E+04	0,786	0,105	26,62	7,97E+04	SD10+RT CD200R	982,376	27,45	4,46E+04	4,98E+04	4,98E+04	0,434	0,362	27,15	5,50E+04	SD6 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD7 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				35,69	1,32E+02	SD8 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD9 -RT CD200R	982,376	38,37	1,98E+01	1,01E+01				44,30	3,00E-01	SD10 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD11+RT CD200R	1325,219	29,10	1,39E+04	1,19E+04	1,19E+04	0,178	0,750	29,59	9,83E+03	SD12+RT CD200R	1325,219	28,61	1,96E+04	1,88E+04	1,88E+04	0,328	0,485	28,73	1,79E+04	SD13+RT CD200R	1325,219	31,25	3,04E+03	2,41E+03	2,41E+03	0,036	1,443	32,00	1,78E+03	SD14+RT CD200R	1325,219	27,85	3,36E+04	3,13E+04	3,13E+04	0,299	0,525	28,06	2,90E+04	SD15+RT CD200R	1325,219	32,36	1,39E+03	1,46E+03	1,46E+03	0,045	1,343	32,22	1,53E+03	SD11 -RT CD200R	1325,219	43,47	5,40E-01	5,40E-01																																																																			
SD4 -RT CD200R	1325,219	39,21	1,10E+01	4,14E+01																																																																																																																																																																																																																																																					
		36,55	7,18E+01					SD5 -RT CD200R	1325,219	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD6 +RT CD200R	982,376	27,49	4,32E+04	4,27E+04	4,27E+04	0,652	0,186	27,52	4,23E+04	SD7 +RT CD200R	982,376	26,24	1,05E+05	9,88E+04	9,88E+04	1,230	0,090	26,41	9,27E+04	SD8 +RT CD200R	982,376	30,99	3,66E+03	2,96E+03	2,96E+03	0,033	1,482	31,67	2,26E+03	SD9 +RT CD200R	982,376	26,65	7,85E+04	7,91E+04	7,91E+04	0,786	0,105	26,62	7,97E+04	SD10+RT CD200R	982,376	27,45	4,46E+04	4,98E+04	4,98E+04	0,434	0,362	27,15	5,50E+04	SD6 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD7 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				35,69	1,32E+02	SD8 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD9 -RT CD200R	982,376	38,37	1,98E+01	1,01E+01				44,30	3,00E-01	SD10 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD11+RT CD200R	1325,219	29,10	1,39E+04	1,19E+04	1,19E+04	0,178	0,750	29,59	9,83E+03	SD12+RT CD200R	1325,219	28,61	1,96E+04	1,88E+04	1,88E+04	0,328	0,485	28,73	1,79E+04	SD13+RT CD200R	1325,219	31,25	3,04E+03	2,41E+03	2,41E+03	0,036	1,443	32,00	1,78E+03	SD14+RT CD200R	1325,219	27,85	3,36E+04	3,13E+04	3,13E+04	0,299	0,525	28,06	2,90E+04	SD15+RT CD200R	1325,219	32,36	1,39E+03	1,46E+03	1,46E+03	0,045	1,343	32,22	1,53E+03	SD11 -RT CD200R	1325,219	43,47	5,40E-01	5,40E-01																																																																													
SD5 -RT CD200R	1325,219	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																																																																																																					
		No Ct	No Ct					SD6 +RT CD200R	982,376	27,49	4,32E+04	4,27E+04	4,27E+04	0,652	0,186	27,52	4,23E+04	SD7 +RT CD200R	982,376	26,24	1,05E+05	9,88E+04	9,88E+04	1,230	0,090	26,41	9,27E+04	SD8 +RT CD200R	982,376	30,99	3,66E+03	2,96E+03	2,96E+03	0,033	1,482	31,67	2,26E+03	SD9 +RT CD200R	982,376	26,65	7,85E+04	7,91E+04	7,91E+04	0,786	0,105	26,62	7,97E+04	SD10+RT CD200R	982,376	27,45	4,46E+04	4,98E+04	4,98E+04	0,434	0,362	27,15	5,50E+04	SD6 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD7 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				35,69	1,32E+02	SD8 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD9 -RT CD200R	982,376	38,37	1,98E+01	1,01E+01				44,30	3,00E-01	SD10 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD11+RT CD200R	1325,219	29,10	1,39E+04	1,19E+04	1,19E+04	0,178	0,750	29,59	9,83E+03	SD12+RT CD200R	1325,219	28,61	1,96E+04	1,88E+04	1,88E+04	0,328	0,485	28,73	1,79E+04	SD13+RT CD200R	1325,219	31,25	3,04E+03	2,41E+03	2,41E+03	0,036	1,443	32,00	1,78E+03	SD14+RT CD200R	1325,219	27,85	3,36E+04	3,13E+04	3,13E+04	0,299	0,525	28,06	2,90E+04	SD15+RT CD200R	1325,219	32,36	1,39E+03	1,46E+03	1,46E+03	0,045	1,343	32,22	1,53E+03	SD11 -RT CD200R	1325,219	43,47	5,40E-01	5,40E-01																																																																																							
SD6 +RT CD200R	982,376	27,49	4,32E+04	4,27E+04	4,27E+04	0,652	0,186																																																																																																																																																																																																																																																		
		27,52	4,23E+04					SD7 +RT CD200R	982,376	26,24	1,05E+05	9,88E+04	9,88E+04	1,230	0,090	26,41	9,27E+04	SD8 +RT CD200R	982,376	30,99	3,66E+03	2,96E+03	2,96E+03	0,033	1,482	31,67	2,26E+03	SD9 +RT CD200R	982,376	26,65	7,85E+04	7,91E+04	7,91E+04	0,786	0,105	26,62	7,97E+04	SD10+RT CD200R	982,376	27,45	4,46E+04	4,98E+04	4,98E+04	0,434	0,362	27,15	5,50E+04	SD6 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD7 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				35,69	1,32E+02	SD8 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD9 -RT CD200R	982,376	38,37	1,98E+01	1,01E+01				44,30	3,00E-01	SD10 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD11+RT CD200R	1325,219	29,10	1,39E+04	1,19E+04	1,19E+04	0,178	0,750	29,59	9,83E+03	SD12+RT CD200R	1325,219	28,61	1,96E+04	1,88E+04	1,88E+04	0,328	0,485	28,73	1,79E+04	SD13+RT CD200R	1325,219	31,25	3,04E+03	2,41E+03	2,41E+03	0,036	1,443	32,00	1,78E+03	SD14+RT CD200R	1325,219	27,85	3,36E+04	3,13E+04	3,13E+04	0,299	0,525	28,06	2,90E+04	SD15+RT CD200R	1325,219	32,36	1,39E+03	1,46E+03	1,46E+03	0,045	1,343	32,22	1,53E+03	SD11 -RT CD200R	1325,219	43,47	5,40E-01	5,40E-01																																																																																																	
SD7 +RT CD200R	982,376	26,24	1,05E+05	9,88E+04	9,88E+04	1,230	0,090																																																																																																																																																																																																																																																		
		26,41	9,27E+04					SD8 +RT CD200R	982,376	30,99	3,66E+03	2,96E+03	2,96E+03	0,033	1,482	31,67	2,26E+03	SD9 +RT CD200R	982,376	26,65	7,85E+04	7,91E+04	7,91E+04	0,786	0,105	26,62	7,97E+04	SD10+RT CD200R	982,376	27,45	4,46E+04	4,98E+04	4,98E+04	0,434	0,362	27,15	5,50E+04	SD6 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD7 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				35,69	1,32E+02	SD8 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD9 -RT CD200R	982,376	38,37	1,98E+01	1,01E+01				44,30	3,00E-01	SD10 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD11+RT CD200R	1325,219	29,10	1,39E+04	1,19E+04	1,19E+04	0,178	0,750	29,59	9,83E+03	SD12+RT CD200R	1325,219	28,61	1,96E+04	1,88E+04	1,88E+04	0,328	0,485	28,73	1,79E+04	SD13+RT CD200R	1325,219	31,25	3,04E+03	2,41E+03	2,41E+03	0,036	1,443	32,00	1,78E+03	SD14+RT CD200R	1325,219	27,85	3,36E+04	3,13E+04	3,13E+04	0,299	0,525	28,06	2,90E+04	SD15+RT CD200R	1325,219	32,36	1,39E+03	1,46E+03	1,46E+03	0,045	1,343	32,22	1,53E+03	SD11 -RT CD200R	1325,219	43,47	5,40E-01	5,40E-01																																																																																																											
SD8 +RT CD200R	982,376	30,99	3,66E+03	2,96E+03	2,96E+03	0,033	1,482																																																																																																																																																																																																																																																		
		31,67	2,26E+03					SD9 +RT CD200R	982,376	26,65	7,85E+04	7,91E+04	7,91E+04	0,786	0,105	26,62	7,97E+04	SD10+RT CD200R	982,376	27,45	4,46E+04	4,98E+04	4,98E+04	0,434	0,362	27,15	5,50E+04	SD6 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD7 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				35,69	1,32E+02	SD8 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD9 -RT CD200R	982,376	38,37	1,98E+01	1,01E+01				44,30	3,00E-01	SD10 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD11+RT CD200R	1325,219	29,10	1,39E+04	1,19E+04	1,19E+04	0,178	0,750	29,59	9,83E+03	SD12+RT CD200R	1325,219	28,61	1,96E+04	1,88E+04	1,88E+04	0,328	0,485	28,73	1,79E+04	SD13+RT CD200R	1325,219	31,25	3,04E+03	2,41E+03	2,41E+03	0,036	1,443	32,00	1,78E+03	SD14+RT CD200R	1325,219	27,85	3,36E+04	3,13E+04	3,13E+04	0,299	0,525	28,06	2,90E+04	SD15+RT CD200R	1325,219	32,36	1,39E+03	1,46E+03	1,46E+03	0,045	1,343	32,22	1,53E+03	SD11 -RT CD200R	1325,219	43,47	5,40E-01	5,40E-01																																																																																																																					
SD9 +RT CD200R	982,376	26,65	7,85E+04	7,91E+04	7,91E+04	0,786	0,105																																																																																																																																																																																																																																																		
		26,62	7,97E+04					SD10+RT CD200R	982,376	27,45	4,46E+04	4,98E+04	4,98E+04	0,434	0,362	27,15	5,50E+04	SD6 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD7 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				35,69	1,32E+02	SD8 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD9 -RT CD200R	982,376	38,37	1,98E+01	1,01E+01				44,30	3,00E-01	SD10 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD11+RT CD200R	1325,219	29,10	1,39E+04	1,19E+04	1,19E+04	0,178	0,750	29,59	9,83E+03	SD12+RT CD200R	1325,219	28,61	1,96E+04	1,88E+04	1,88E+04	0,328	0,485	28,73	1,79E+04	SD13+RT CD200R	1325,219	31,25	3,04E+03	2,41E+03	2,41E+03	0,036	1,443	32,00	1,78E+03	SD14+RT CD200R	1325,219	27,85	3,36E+04	3,13E+04	3,13E+04	0,299	0,525	28,06	2,90E+04	SD15+RT CD200R	1325,219	32,36	1,39E+03	1,46E+03	1,46E+03	0,045	1,343	32,22	1,53E+03	SD11 -RT CD200R	1325,219	43,47	5,40E-01	5,40E-01																																																																																																																															
SD10+RT CD200R	982,376	27,45	4,46E+04	4,98E+04	4,98E+04	0,434	0,362																																																																																																																																																																																																																																																		
		27,15	5,50E+04					SD6 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD7 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				35,69	1,32E+02	SD8 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD9 -RT CD200R	982,376	38,37	1,98E+01	1,01E+01				44,30	3,00E-01	SD10 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD11+RT CD200R	1325,219	29,10	1,39E+04	1,19E+04	1,19E+04	0,178	0,750	29,59	9,83E+03	SD12+RT CD200R	1325,219	28,61	1,96E+04	1,88E+04	1,88E+04	0,328	0,485	28,73	1,79E+04	SD13+RT CD200R	1325,219	31,25	3,04E+03	2,41E+03	2,41E+03	0,036	1,443	32,00	1,78E+03	SD14+RT CD200R	1325,219	27,85	3,36E+04	3,13E+04	3,13E+04	0,299	0,525	28,06	2,90E+04	SD15+RT CD200R	1325,219	32,36	1,39E+03	1,46E+03	1,46E+03	0,045	1,343	32,22	1,53E+03	SD11 -RT CD200R	1325,219	43,47	5,40E-01	5,40E-01																																																																																																																																									
SD6 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																																																																																																					
		No Ct	No Ct					SD7 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				35,69	1,32E+02	SD8 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD9 -RT CD200R	982,376	38,37	1,98E+01	1,01E+01				44,30	3,00E-01	SD10 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD11+RT CD200R	1325,219	29,10	1,39E+04	1,19E+04	1,19E+04	0,178	0,750	29,59	9,83E+03	SD12+RT CD200R	1325,219	28,61	1,96E+04	1,88E+04	1,88E+04	0,328	0,485	28,73	1,79E+04	SD13+RT CD200R	1325,219	31,25	3,04E+03	2,41E+03	2,41E+03	0,036	1,443	32,00	1,78E+03	SD14+RT CD200R	1325,219	27,85	3,36E+04	3,13E+04	3,13E+04	0,299	0,525	28,06	2,90E+04	SD15+RT CD200R	1325,219	32,36	1,39E+03	1,46E+03	1,46E+03	0,045	1,343	32,22	1,53E+03	SD11 -RT CD200R	1325,219	43,47	5,40E-01	5,40E-01																																																																																																																																																			
SD7 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																																																																																																					
		35,69	1,32E+02					SD8 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD9 -RT CD200R	982,376	38,37	1,98E+01	1,01E+01				44,30	3,00E-01	SD10 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD11+RT CD200R	1325,219	29,10	1,39E+04	1,19E+04	1,19E+04	0,178	0,750	29,59	9,83E+03	SD12+RT CD200R	1325,219	28,61	1,96E+04	1,88E+04	1,88E+04	0,328	0,485	28,73	1,79E+04	SD13+RT CD200R	1325,219	31,25	3,04E+03	2,41E+03	2,41E+03	0,036	1,443	32,00	1,78E+03	SD14+RT CD200R	1325,219	27,85	3,36E+04	3,13E+04	3,13E+04	0,299	0,525	28,06	2,90E+04	SD15+RT CD200R	1325,219	32,36	1,39E+03	1,46E+03	1,46E+03	0,045	1,343	32,22	1,53E+03	SD11 -RT CD200R	1325,219	43,47	5,40E-01	5,40E-01																																																																																																																																																													
SD8 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																																																																																																					
		No Ct	No Ct					SD9 -RT CD200R	982,376	38,37	1,98E+01	1,01E+01				44,30	3,00E-01	SD10 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD11+RT CD200R	1325,219	29,10	1,39E+04	1,19E+04	1,19E+04	0,178	0,750	29,59	9,83E+03	SD12+RT CD200R	1325,219	28,61	1,96E+04	1,88E+04	1,88E+04	0,328	0,485	28,73	1,79E+04	SD13+RT CD200R	1325,219	31,25	3,04E+03	2,41E+03	2,41E+03	0,036	1,443	32,00	1,78E+03	SD14+RT CD200R	1325,219	27,85	3,36E+04	3,13E+04	3,13E+04	0,299	0,525	28,06	2,90E+04	SD15+RT CD200R	1325,219	32,36	1,39E+03	1,46E+03	1,46E+03	0,045	1,343	32,22	1,53E+03	SD11 -RT CD200R	1325,219	43,47	5,40E-01	5,40E-01																																																																																																																																																																							
SD9 -RT CD200R	982,376	38,37	1,98E+01	1,01E+01																																																																																																																																																																																																																																																					
		44,30	3,00E-01					SD10 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct				No Ct	No Ct	SD11+RT CD200R	1325,219	29,10	1,39E+04	1,19E+04	1,19E+04	0,178	0,750	29,59	9,83E+03	SD12+RT CD200R	1325,219	28,61	1,96E+04	1,88E+04	1,88E+04	0,328	0,485	28,73	1,79E+04	SD13+RT CD200R	1325,219	31,25	3,04E+03	2,41E+03	2,41E+03	0,036	1,443	32,00	1,78E+03	SD14+RT CD200R	1325,219	27,85	3,36E+04	3,13E+04	3,13E+04	0,299	0,525	28,06	2,90E+04	SD15+RT CD200R	1325,219	32,36	1,39E+03	1,46E+03	1,46E+03	0,045	1,343	32,22	1,53E+03	SD11 -RT CD200R	1325,219	43,47	5,40E-01	5,40E-01																																																																																																																																																																																	
SD10 -RT CD200R	982,376	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																																																																																																					
		No Ct	No Ct					SD11+RT CD200R	1325,219	29,10	1,39E+04	1,19E+04	1,19E+04	0,178	0,750	29,59	9,83E+03	SD12+RT CD200R	1325,219	28,61	1,96E+04	1,88E+04	1,88E+04	0,328	0,485	28,73	1,79E+04	SD13+RT CD200R	1325,219	31,25	3,04E+03	2,41E+03	2,41E+03	0,036	1,443	32,00	1,78E+03	SD14+RT CD200R	1325,219	27,85	3,36E+04	3,13E+04	3,13E+04	0,299	0,525	28,06	2,90E+04	SD15+RT CD200R	1325,219	32,36	1,39E+03	1,46E+03	1,46E+03	0,045	1,343	32,22	1,53E+03	SD11 -RT CD200R	1325,219	43,47	5,40E-01	5,40E-01																																																																																																																																																																																											
SD11+RT CD200R	1325,219	29,10	1,39E+04	1,19E+04	1,19E+04	0,178	0,750																																																																																																																																																																																																																																																		
		29,59	9,83E+03					SD12+RT CD200R	1325,219	28,61	1,96E+04	1,88E+04	1,88E+04	0,328	0,485	28,73	1,79E+04	SD13+RT CD200R	1325,219	31,25	3,04E+03	2,41E+03	2,41E+03	0,036	1,443	32,00	1,78E+03	SD14+RT CD200R	1325,219	27,85	3,36E+04	3,13E+04	3,13E+04	0,299	0,525	28,06	2,90E+04	SD15+RT CD200R	1325,219	32,36	1,39E+03	1,46E+03	1,46E+03	0,045	1,343	32,22	1,53E+03	SD11 -RT CD200R	1325,219	43,47	5,40E-01	5,40E-01																																																																																																																																																																																																					
SD12+RT CD200R	1325,219	28,61	1,96E+04	1,88E+04	1,88E+04	0,328	0,485																																																																																																																																																																																																																																																		
		28,73	1,79E+04					SD13+RT CD200R	1325,219	31,25	3,04E+03	2,41E+03	2,41E+03	0,036	1,443	32,00	1,78E+03	SD14+RT CD200R	1325,219	27,85	3,36E+04	3,13E+04	3,13E+04	0,299	0,525	28,06	2,90E+04	SD15+RT CD200R	1325,219	32,36	1,39E+03	1,46E+03	1,46E+03	0,045	1,343	32,22	1,53E+03	SD11 -RT CD200R	1325,219	43,47	5,40E-01	5,40E-01																																																																																																																																																																																																															
SD13+RT CD200R	1325,219	31,25	3,04E+03	2,41E+03	2,41E+03	0,036	1,443																																																																																																																																																																																																																																																		
		32,00	1,78E+03					SD14+RT CD200R	1325,219	27,85	3,36E+04	3,13E+04	3,13E+04	0,299	0,525	28,06	2,90E+04	SD15+RT CD200R	1325,219	32,36	1,39E+03	1,46E+03	1,46E+03	0,045	1,343	32,22	1,53E+03	SD11 -RT CD200R	1325,219	43,47	5,40E-01	5,40E-01																																																																																																																																																																																																																									
SD14+RT CD200R	1325,219	27,85	3,36E+04	3,13E+04	3,13E+04	0,299	0,525																																																																																																																																																																																																																																																		
		28,06	2,90E+04					SD15+RT CD200R	1325,219	32,36	1,39E+03	1,46E+03	1,46E+03	0,045	1,343	32,22	1,53E+03	SD11 -RT CD200R	1325,219	43,47	5,40E-01	5,40E-01																																																																																																																																																																																																																																			
SD15+RT CD200R	1325,219	32,36	1,39E+03	1,46E+03	1,46E+03	0,045	1,343																																																																																																																																																																																																																																																		
		32,22	1,53E+03					SD11 -RT CD200R	1325,219	43,47	5,40E-01	5,40E-01																																																																																																																																																																																																																																													
SD11 -RT CD200R	1325,219	43,47	5,40E-01	5,40E-01																																																																																																																																																																																																																																																					

		No Ct	No Ct				
SD12 -RT CD200R	1325,219	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD13 -RT CD200R	1325,219	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD14 -RT CD200R	1325,219	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD15 -RT CD200R	1325,219	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD16+RT CD200R	1634,863	27,38	4,68E+04	5,69E+04	5,69E+04	1,456	0,163
		26,87	6,71E+04				
SD17+RT CD200R	1634,863	28,02	2,98E+04	2,83E+04	2,83E+04	0,485	0,314
		28,17	2,68E+04				
SD18+RT CD200R	1634,863	32,49	1,27E+03	1,36E+03	1,36E+03	0,017	1,770
		32,30	1,45E+03				
SD19+RT CD200R	1634,863	27,99	3,04E+04	3,29E+04	3,29E+04	0,456	0,341
		27,77	3,54E+04				
SD20+RT CD200R	1634,863	29,95	7,59E+03	9,04E+03	9,04E+03	0,145	0,840
		29,49	1,05E+04				
SD16-RT CD200R	1634,863	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD17-RT CD200R	1634,863	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD18-RT CD200R	1634,863	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD19-RT CD200R	1634,863	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD20-RT CD200R	1634,863	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD21+RT CD200R	1454,081	31,76	2,12E+03	2,40E+03	2,35E+03	0,041	1,382
		31,43	2,67E+03				
SD22+RT CD200R	1454,081	30,16	6,55E+03	5,71E+03	5,71E+03	0,176	0,755
		30,58	4,87E+03				
SD23+RT CD200R	1454,081	30,82	4,13E+03	4,48E+03	4,44E+03	0,037	1,430
		30,59	4,83E+03				
SD24+RT CD200R	1454,081	31,03	3,54E+03	3,80E+03	3,80E+03	0,029	1,531
		30,84	4,06E+03				
SD25+RT CD200R	1454,081	30,47	5,26E+03	5,07E+03	5,07E+03	0,113	0,946
		30,58	4,89E+03				
SD21-RT CD200R	1454,081	38,86	1,40E+01	4,34E+01			
		36,53	7,29E+01				
SD22-RT CD200R	1454,081	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD23-RT CD200R	1454,081	37,58	3,46E+01	3,46E+01			
		No Ct	No Ct				
SD24-RT CD200R	1454,081	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD25-RT CD200R	1454,081	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD26+RT CD200R	1478,313	31,28	2,97E+03	2,73E+03	2,73E+03	0,218	0,662
		31,53	2,49E+03				
SD27+RT CD200R	1478,313	30,34	5,77E+03	5,90E+03	5,90E+03	0,704	0,152
		30,28	6,04E+03				
SD28+RT CD200R	1478,313	30,80	4,16E+03	3,94E+03	3,94E+03	0,272	0,565
		30,96	3,72E+03				
SD2+RT CD200R	1478,313	30,12	6,74E+03	6,79E+03	6,79E+03	0,180	0,745
		30,10	6,84E+03				

SD30+RT CD200R	1478,313	29,49	1,05E+04	1,14E+04	1,14E+04	0,063	1,199
		29,28	1,22E+04				
SD26-RT CD200R	1478,313	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD27-RT CD200R	1478,313	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD28-RT CD200R	1478,313	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD29-RT CD200R	1478,313	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD30-RT CD200R	1478,313	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD31+RT CD200R	1325,219	31,39	2,75E+03	2,11E+03	2,11E+03	0,101	0,996
		32,29	1,46E+03				
SD32+RT CD200R	1325,219	33,09	8,29E+02	7,27E+02	7,27E+02	0,016	1,805
		33,49	6,25E+02				
SD33+RT CD200R	1325,219	33,90	4,68E+02	3,37E+02	3,37E+02	0,027	1,565
		35,06	2,06E+02				
SD34+RT CD200R	1325,219	28,28	2,47E+04	2,11E+04	2,11E+04	0,499	0,302
		28,78	1,74E+04				
SD35+RT CD200R	1325,219	31,54	2,47E+03	2,05E+03	2,05E+03	0,322	0,492
		32,13	1,63E+03				
SD31-RT CD200R	1325,219	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD32-RT CD200R	1325,219	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD33-RT CD200R	1325,219	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD34-RT CD200R	1325,219	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				
SD35-RT CD200R	1325,219	No Ct	No Ct	No Ct			
		No Ct	No Ct				

Goup	mean value CD200R/cmyc	standard deviation	mittelwert log10 (CD200R/cmyc)	Stabwn log10 CD200R/cmyc	Stabwn log10 (CD200R/cmyc)/Wurzel(n)
SD1-SD5 mock	1,16E-02	6,20E-03	-2,02E+00	2,76E-01	5,53E-02
SD6-SD10 wt d2	6,27E-01	3,95E-01	-4,09E-01	5,56E-01	2,49E-01
SD11-SD15 ko d2	1,77E-01	1,22E-01	-9,09E-01	4,06E-01	1,82E-01
SD16-SD20 rev d2	5,12E-01	5,05E-01	#DIV/0!	6,56E-01	2,94E-01
SD21-SD25 wt d6	7,94E-02	5,69E-02	-1,21E+00	3,03E-01	1,35E-01
SD26-SD30 ko d6	2,87E-01	2,19E-01	-6,65E-01	3,36E-01	1,50E-01
SD31-SD35 rev d6	1,93E-01	1,89E-01	-1,03E+00	5,84E-01	2,61E-01

8.6.5 Rohdaten TaqMan-PCR cMyc

Well Name	Threshold (dR)	Ct (dR)	Quantity (copies)	Quantity Avg. (copies)	-RT bereinigt																																																																																																																																																																																												
SD1spleen_cMyc+RT	565,997	20,73	1,52E+05	1,42E+05	1,42E+05																																																																																																																																																																																												
		20,94	1,32E+05			SD2spleen_cMyc+RT	565,997	21,30	1,02E+05	8,52E+04	8,52E+04	21,87	6,85E+04	SD3spleen_cMyc+RT	565,997	20,35	1,99E+05	1,58E+05	1,58E+05	21,11	1,17E+05	SD4spleen_cMyc+RT	565,997	20,33	2,02E+05	1,71E+05	1,71E+05	20,86	1,40E+05	SD5spleen_cMyc+RT	565,997	22,80	3,54E+04	3,12E+04	3,12E+04	23,18	2,71E+04	SD1spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		37,35	1,23E+00	SD2spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD3spleen_cMyc-RT	562,755	36,11	2,95E+00	2,95E+00		No Ct	No Ct	SD4spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		36,52	2,21E+00	SD5spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD6spleen_cMyc+RT	565,997	22,07	5,94E+04	6,55E+04	6,55E+04	21,80	7,16E+04	SD7spleen_cMyc+RT	565,997	21,51	8,79E+04	8,03E+04	8,03E+04	21,78	7,27E+04	SD8spleen_cMyc+RT	565,997	21,54	8,62E+04	8,96E+04	8,96E+04	21,43	9,31E+04	SD9spleen_cMyc+RT	565,997	21,08	1,19E+05	1,01E+05	1,01E+05	21,61	8,19E+04	SD10spleen_cMyc+RT	565,997	21,31	1,01E+05	1,15E+05	1,15E+05	20,98	1,28E+05	SD6spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD7spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD8spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD9spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD10spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD11spleen_cMyc+RT	565,997	21,76	7,37E+04	6,67E+04	6,67E+04	22,06	5,97E+04	SD12spleen_cMyc+RT	565,997	21,99	6,28E+04	5,74E+04	5,74E+04	22,26	5,20E+04	SD13spleen_cMyc+RT	565,997	22,06	5,96E+04	6,70E+04	6,70E+04	21,75	7,43E+04	SD14spleen_cMyc+RT	565,997	21,13	1,15E+05	1,05E+05	1,05E+05	21,42	9,41E+04	SD15spleen_cMyc+RT	565,997	22,89	3,33E+04
SD2spleen_cMyc+RT	565,997	21,30	1,02E+05	8,52E+04	8,52E+04																																																																																																																																																																																												
		21,87	6,85E+04			SD3spleen_cMyc+RT	565,997	20,35	1,99E+05	1,58E+05	1,58E+05	21,11	1,17E+05	SD4spleen_cMyc+RT	565,997	20,33	2,02E+05	1,71E+05	1,71E+05	20,86	1,40E+05	SD5spleen_cMyc+RT	565,997	22,80	3,54E+04	3,12E+04	3,12E+04	23,18	2,71E+04	SD1spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		37,35	1,23E+00	SD2spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD3spleen_cMyc-RT	562,755	36,11	2,95E+00	2,95E+00		No Ct	No Ct	SD4spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		36,52	2,21E+00	SD5spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD6spleen_cMyc+RT	565,997	22,07	5,94E+04	6,55E+04	6,55E+04	21,80	7,16E+04	SD7spleen_cMyc+RT	565,997	21,51	8,79E+04	8,03E+04	8,03E+04	21,78	7,27E+04	SD8spleen_cMyc+RT	565,997	21,54	8,62E+04	8,96E+04	8,96E+04	21,43	9,31E+04	SD9spleen_cMyc+RT	565,997	21,08	1,19E+05	1,01E+05	1,01E+05	21,61	8,19E+04	SD10spleen_cMyc+RT	565,997	21,31	1,01E+05	1,15E+05	1,15E+05	20,98	1,28E+05	SD6spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD7spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD8spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD9spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD10spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD11spleen_cMyc+RT	565,997	21,76	7,37E+04	6,67E+04	6,67E+04	22,06	5,97E+04	SD12spleen_cMyc+RT	565,997	21,99	6,28E+04	5,74E+04	5,74E+04	22,26	5,20E+04	SD13spleen_cMyc+RT	565,997	22,06	5,96E+04	6,70E+04	6,70E+04	21,75	7,43E+04	SD14spleen_cMyc+RT	565,997	21,13	1,15E+05	1,05E+05	1,05E+05	21,42	9,41E+04	SD15spleen_cMyc+RT	565,997	22,89	3,33E+04	3,21E+04	3,21E+04	22,99	3,09E+04				
SD3spleen_cMyc+RT	565,997	20,35	1,99E+05	1,58E+05	1,58E+05																																																																																																																																																																																												
		21,11	1,17E+05			SD4spleen_cMyc+RT	565,997	20,33	2,02E+05	1,71E+05	1,71E+05	20,86	1,40E+05	SD5spleen_cMyc+RT	565,997	22,80	3,54E+04	3,12E+04	3,12E+04	23,18	2,71E+04	SD1spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		37,35	1,23E+00	SD2spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD3spleen_cMyc-RT	562,755	36,11	2,95E+00	2,95E+00		No Ct	No Ct	SD4spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		36,52	2,21E+00	SD5spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD6spleen_cMyc+RT	565,997	22,07	5,94E+04	6,55E+04	6,55E+04	21,80	7,16E+04	SD7spleen_cMyc+RT	565,997	21,51	8,79E+04	8,03E+04	8,03E+04	21,78	7,27E+04	SD8spleen_cMyc+RT	565,997	21,54	8,62E+04	8,96E+04	8,96E+04	21,43	9,31E+04	SD9spleen_cMyc+RT	565,997	21,08	1,19E+05	1,01E+05	1,01E+05	21,61	8,19E+04	SD10spleen_cMyc+RT	565,997	21,31	1,01E+05	1,15E+05	1,15E+05	20,98	1,28E+05	SD6spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD7spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD8spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD9spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD10spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD11spleen_cMyc+RT	565,997	21,76	7,37E+04	6,67E+04	6,67E+04	22,06	5,97E+04	SD12spleen_cMyc+RT	565,997	21,99	6,28E+04	5,74E+04	5,74E+04	22,26	5,20E+04	SD13spleen_cMyc+RT	565,997	22,06	5,96E+04	6,70E+04	6,70E+04	21,75	7,43E+04	SD14spleen_cMyc+RT	565,997	21,13	1,15E+05	1,05E+05	1,05E+05	21,42	9,41E+04	SD15spleen_cMyc+RT	565,997	22,89	3,33E+04	3,21E+04	3,21E+04	22,99	3,09E+04												
SD4spleen_cMyc+RT	565,997	20,33	2,02E+05	1,71E+05	1,71E+05																																																																																																																																																																																												
		20,86	1,40E+05			SD5spleen_cMyc+RT	565,997	22,80	3,54E+04	3,12E+04	3,12E+04	23,18	2,71E+04	SD1spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		37,35	1,23E+00	SD2spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD3spleen_cMyc-RT	562,755	36,11	2,95E+00	2,95E+00		No Ct	No Ct	SD4spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		36,52	2,21E+00	SD5spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD6spleen_cMyc+RT	565,997	22,07	5,94E+04	6,55E+04	6,55E+04	21,80	7,16E+04	SD7spleen_cMyc+RT	565,997	21,51	8,79E+04	8,03E+04	8,03E+04	21,78	7,27E+04	SD8spleen_cMyc+RT	565,997	21,54	8,62E+04	8,96E+04	8,96E+04	21,43	9,31E+04	SD9spleen_cMyc+RT	565,997	21,08	1,19E+05	1,01E+05	1,01E+05	21,61	8,19E+04	SD10spleen_cMyc+RT	565,997	21,31	1,01E+05	1,15E+05	1,15E+05	20,98	1,28E+05	SD6spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD7spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD8spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD9spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD10spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD11spleen_cMyc+RT	565,997	21,76	7,37E+04	6,67E+04	6,67E+04	22,06	5,97E+04	SD12spleen_cMyc+RT	565,997	21,99	6,28E+04	5,74E+04	5,74E+04	22,26	5,20E+04	SD13spleen_cMyc+RT	565,997	22,06	5,96E+04	6,70E+04	6,70E+04	21,75	7,43E+04	SD14spleen_cMyc+RT	565,997	21,13	1,15E+05	1,05E+05	1,05E+05	21,42	9,41E+04	SD15spleen_cMyc+RT	565,997	22,89	3,33E+04	3,21E+04	3,21E+04	22,99	3,09E+04																				
SD5spleen_cMyc+RT	565,997	22,80	3,54E+04	3,12E+04	3,12E+04																																																																																																																																																																																												
		23,18	2,71E+04			SD1spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		37,35	1,23E+00	SD2spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD3spleen_cMyc-RT	562,755	36,11	2,95E+00	2,95E+00		No Ct	No Ct	SD4spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		36,52	2,21E+00	SD5spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD6spleen_cMyc+RT	565,997	22,07	5,94E+04	6,55E+04	6,55E+04	21,80	7,16E+04	SD7spleen_cMyc+RT	565,997	21,51	8,79E+04	8,03E+04	8,03E+04	21,78	7,27E+04	SD8spleen_cMyc+RT	565,997	21,54	8,62E+04	8,96E+04	8,96E+04	21,43	9,31E+04	SD9spleen_cMyc+RT	565,997	21,08	1,19E+05	1,01E+05	1,01E+05	21,61	8,19E+04	SD10spleen_cMyc+RT	565,997	21,31	1,01E+05	1,15E+05	1,15E+05	20,98	1,28E+05	SD6spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD7spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD8spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD9spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD10spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD11spleen_cMyc+RT	565,997	21,76	7,37E+04	6,67E+04	6,67E+04	22,06	5,97E+04	SD12spleen_cMyc+RT	565,997	21,99	6,28E+04	5,74E+04	5,74E+04	22,26	5,20E+04	SD13spleen_cMyc+RT	565,997	22,06	5,96E+04	6,70E+04	6,70E+04	21,75	7,43E+04	SD14spleen_cMyc+RT	565,997	21,13	1,15E+05	1,05E+05	1,05E+05	21,42	9,41E+04	SD15spleen_cMyc+RT	565,997	22,89	3,33E+04	3,21E+04	3,21E+04	22,99	3,09E+04																												
SD1spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																																													
		37,35	1,23E+00			SD2spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD3spleen_cMyc-RT	562,755	36,11	2,95E+00	2,95E+00		No Ct	No Ct	SD4spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		36,52	2,21E+00	SD5spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD6spleen_cMyc+RT	565,997	22,07	5,94E+04	6,55E+04	6,55E+04	21,80	7,16E+04	SD7spleen_cMyc+RT	565,997	21,51	8,79E+04	8,03E+04	8,03E+04	21,78	7,27E+04	SD8spleen_cMyc+RT	565,997	21,54	8,62E+04	8,96E+04	8,96E+04	21,43	9,31E+04	SD9spleen_cMyc+RT	565,997	21,08	1,19E+05	1,01E+05	1,01E+05	21,61	8,19E+04	SD10spleen_cMyc+RT	565,997	21,31	1,01E+05	1,15E+05	1,15E+05	20,98	1,28E+05	SD6spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD7spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD8spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD9spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD10spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD11spleen_cMyc+RT	565,997	21,76	7,37E+04	6,67E+04	6,67E+04	22,06	5,97E+04	SD12spleen_cMyc+RT	565,997	21,99	6,28E+04	5,74E+04	5,74E+04	22,26	5,20E+04	SD13spleen_cMyc+RT	565,997	22,06	5,96E+04	6,70E+04	6,70E+04	21,75	7,43E+04	SD14spleen_cMyc+RT	565,997	21,13	1,15E+05	1,05E+05	1,05E+05	21,42	9,41E+04	SD15spleen_cMyc+RT	565,997	22,89	3,33E+04	3,21E+04	3,21E+04	22,99	3,09E+04																																				
SD2spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																																													
		No Ct	No Ct			SD3spleen_cMyc-RT	562,755	36,11	2,95E+00	2,95E+00		No Ct	No Ct	SD4spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		36,52	2,21E+00	SD5spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD6spleen_cMyc+RT	565,997	22,07	5,94E+04	6,55E+04	6,55E+04	21,80	7,16E+04	SD7spleen_cMyc+RT	565,997	21,51	8,79E+04	8,03E+04	8,03E+04	21,78	7,27E+04	SD8spleen_cMyc+RT	565,997	21,54	8,62E+04	8,96E+04	8,96E+04	21,43	9,31E+04	SD9spleen_cMyc+RT	565,997	21,08	1,19E+05	1,01E+05	1,01E+05	21,61	8,19E+04	SD10spleen_cMyc+RT	565,997	21,31	1,01E+05	1,15E+05	1,15E+05	20,98	1,28E+05	SD6spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD7spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD8spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD9spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD10spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD11spleen_cMyc+RT	565,997	21,76	7,37E+04	6,67E+04	6,67E+04	22,06	5,97E+04	SD12spleen_cMyc+RT	565,997	21,99	6,28E+04	5,74E+04	5,74E+04	22,26	5,20E+04	SD13spleen_cMyc+RT	565,997	22,06	5,96E+04	6,70E+04	6,70E+04	21,75	7,43E+04	SD14spleen_cMyc+RT	565,997	21,13	1,15E+05	1,05E+05	1,05E+05	21,42	9,41E+04	SD15spleen_cMyc+RT	565,997	22,89	3,33E+04	3,21E+04	3,21E+04	22,99	3,09E+04																																												
SD3spleen_cMyc-RT	562,755	36,11	2,95E+00	2,95E+00																																																																																																																																																																																													
		No Ct	No Ct			SD4spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		36,52	2,21E+00	SD5spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD6spleen_cMyc+RT	565,997	22,07	5,94E+04	6,55E+04	6,55E+04	21,80	7,16E+04	SD7spleen_cMyc+RT	565,997	21,51	8,79E+04	8,03E+04	8,03E+04	21,78	7,27E+04	SD8spleen_cMyc+RT	565,997	21,54	8,62E+04	8,96E+04	8,96E+04	21,43	9,31E+04	SD9spleen_cMyc+RT	565,997	21,08	1,19E+05	1,01E+05	1,01E+05	21,61	8,19E+04	SD10spleen_cMyc+RT	565,997	21,31	1,01E+05	1,15E+05	1,15E+05	20,98	1,28E+05	SD6spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD7spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD8spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD9spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD10spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD11spleen_cMyc+RT	565,997	21,76	7,37E+04	6,67E+04	6,67E+04	22,06	5,97E+04	SD12spleen_cMyc+RT	565,997	21,99	6,28E+04	5,74E+04	5,74E+04	22,26	5,20E+04	SD13spleen_cMyc+RT	565,997	22,06	5,96E+04	6,70E+04	6,70E+04	21,75	7,43E+04	SD14spleen_cMyc+RT	565,997	21,13	1,15E+05	1,05E+05	1,05E+05	21,42	9,41E+04	SD15spleen_cMyc+RT	565,997	22,89	3,33E+04	3,21E+04	3,21E+04	22,99	3,09E+04																																																				
SD4spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																																													
		36,52	2,21E+00			SD5spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD6spleen_cMyc+RT	565,997	22,07	5,94E+04	6,55E+04	6,55E+04	21,80	7,16E+04	SD7spleen_cMyc+RT	565,997	21,51	8,79E+04	8,03E+04	8,03E+04	21,78	7,27E+04	SD8spleen_cMyc+RT	565,997	21,54	8,62E+04	8,96E+04	8,96E+04	21,43	9,31E+04	SD9spleen_cMyc+RT	565,997	21,08	1,19E+05	1,01E+05	1,01E+05	21,61	8,19E+04	SD10spleen_cMyc+RT	565,997	21,31	1,01E+05	1,15E+05	1,15E+05	20,98	1,28E+05	SD6spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD7spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD8spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD9spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD10spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD11spleen_cMyc+RT	565,997	21,76	7,37E+04	6,67E+04	6,67E+04	22,06	5,97E+04	SD12spleen_cMyc+RT	565,997	21,99	6,28E+04	5,74E+04	5,74E+04	22,26	5,20E+04	SD13spleen_cMyc+RT	565,997	22,06	5,96E+04	6,70E+04	6,70E+04	21,75	7,43E+04	SD14spleen_cMyc+RT	565,997	21,13	1,15E+05	1,05E+05	1,05E+05	21,42	9,41E+04	SD15spleen_cMyc+RT	565,997	22,89	3,33E+04	3,21E+04	3,21E+04	22,99	3,09E+04																																																												
SD5spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																																													
		No Ct	No Ct			SD6spleen_cMyc+RT	565,997	22,07	5,94E+04	6,55E+04	6,55E+04	21,80	7,16E+04	SD7spleen_cMyc+RT	565,997	21,51	8,79E+04	8,03E+04	8,03E+04	21,78	7,27E+04	SD8spleen_cMyc+RT	565,997	21,54	8,62E+04	8,96E+04	8,96E+04	21,43	9,31E+04	SD9spleen_cMyc+RT	565,997	21,08	1,19E+05	1,01E+05	1,01E+05	21,61	8,19E+04	SD10spleen_cMyc+RT	565,997	21,31	1,01E+05	1,15E+05	1,15E+05	20,98	1,28E+05	SD6spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD7spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD8spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD9spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD10spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD11spleen_cMyc+RT	565,997	21,76	7,37E+04	6,67E+04	6,67E+04	22,06	5,97E+04	SD12spleen_cMyc+RT	565,997	21,99	6,28E+04	5,74E+04	5,74E+04	22,26	5,20E+04	SD13spleen_cMyc+RT	565,997	22,06	5,96E+04	6,70E+04	6,70E+04	21,75	7,43E+04	SD14spleen_cMyc+RT	565,997	21,13	1,15E+05	1,05E+05	1,05E+05	21,42	9,41E+04	SD15spleen_cMyc+RT	565,997	22,89	3,33E+04	3,21E+04	3,21E+04	22,99	3,09E+04																																																																				
SD6spleen_cMyc+RT	565,997	22,07	5,94E+04	6,55E+04	6,55E+04																																																																																																																																																																																												
		21,80	7,16E+04			SD7spleen_cMyc+RT	565,997	21,51	8,79E+04	8,03E+04	8,03E+04	21,78	7,27E+04	SD8spleen_cMyc+RT	565,997	21,54	8,62E+04	8,96E+04	8,96E+04	21,43	9,31E+04	SD9spleen_cMyc+RT	565,997	21,08	1,19E+05	1,01E+05	1,01E+05	21,61	8,19E+04	SD10spleen_cMyc+RT	565,997	21,31	1,01E+05	1,15E+05	1,15E+05	20,98	1,28E+05	SD6spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD7spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD8spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD9spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD10spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD11spleen_cMyc+RT	565,997	21,76	7,37E+04	6,67E+04	6,67E+04	22,06	5,97E+04	SD12spleen_cMyc+RT	565,997	21,99	6,28E+04	5,74E+04	5,74E+04	22,26	5,20E+04	SD13spleen_cMyc+RT	565,997	22,06	5,96E+04	6,70E+04	6,70E+04	21,75	7,43E+04	SD14spleen_cMyc+RT	565,997	21,13	1,15E+05	1,05E+05	1,05E+05	21,42	9,41E+04	SD15spleen_cMyc+RT	565,997	22,89	3,33E+04	3,21E+04	3,21E+04	22,99	3,09E+04																																																																												
SD7spleen_cMyc+RT	565,997	21,51	8,79E+04	8,03E+04	8,03E+04																																																																																																																																																																																												
		21,78	7,27E+04			SD8spleen_cMyc+RT	565,997	21,54	8,62E+04	8,96E+04	8,96E+04	21,43	9,31E+04	SD9spleen_cMyc+RT	565,997	21,08	1,19E+05	1,01E+05	1,01E+05	21,61	8,19E+04	SD10spleen_cMyc+RT	565,997	21,31	1,01E+05	1,15E+05	1,15E+05	20,98	1,28E+05	SD6spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD7spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD8spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD9spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD10spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD11spleen_cMyc+RT	565,997	21,76	7,37E+04	6,67E+04	6,67E+04	22,06	5,97E+04	SD12spleen_cMyc+RT	565,997	21,99	6,28E+04	5,74E+04	5,74E+04	22,26	5,20E+04	SD13spleen_cMyc+RT	565,997	22,06	5,96E+04	6,70E+04	6,70E+04	21,75	7,43E+04	SD14spleen_cMyc+RT	565,997	21,13	1,15E+05	1,05E+05	1,05E+05	21,42	9,41E+04	SD15spleen_cMyc+RT	565,997	22,89	3,33E+04	3,21E+04	3,21E+04	22,99	3,09E+04																																																																																				
SD8spleen_cMyc+RT	565,997	21,54	8,62E+04	8,96E+04	8,96E+04																																																																																																																																																																																												
		21,43	9,31E+04			SD9spleen_cMyc+RT	565,997	21,08	1,19E+05	1,01E+05	1,01E+05	21,61	8,19E+04	SD10spleen_cMyc+RT	565,997	21,31	1,01E+05	1,15E+05	1,15E+05	20,98	1,28E+05	SD6spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD7spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD8spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD9spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD10spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD11spleen_cMyc+RT	565,997	21,76	7,37E+04	6,67E+04	6,67E+04	22,06	5,97E+04	SD12spleen_cMyc+RT	565,997	21,99	6,28E+04	5,74E+04	5,74E+04	22,26	5,20E+04	SD13spleen_cMyc+RT	565,997	22,06	5,96E+04	6,70E+04	6,70E+04	21,75	7,43E+04	SD14spleen_cMyc+RT	565,997	21,13	1,15E+05	1,05E+05	1,05E+05	21,42	9,41E+04	SD15spleen_cMyc+RT	565,997	22,89	3,33E+04	3,21E+04	3,21E+04	22,99	3,09E+04																																																																																												
SD9spleen_cMyc+RT	565,997	21,08	1,19E+05	1,01E+05	1,01E+05																																																																																																																																																																																												
		21,61	8,19E+04			SD10spleen_cMyc+RT	565,997	21,31	1,01E+05	1,15E+05	1,15E+05	20,98	1,28E+05	SD6spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD7spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD8spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD9spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD10spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD11spleen_cMyc+RT	565,997	21,76	7,37E+04	6,67E+04	6,67E+04	22,06	5,97E+04	SD12spleen_cMyc+RT	565,997	21,99	6,28E+04	5,74E+04	5,74E+04	22,26	5,20E+04	SD13spleen_cMyc+RT	565,997	22,06	5,96E+04	6,70E+04	6,70E+04	21,75	7,43E+04	SD14spleen_cMyc+RT	565,997	21,13	1,15E+05	1,05E+05	1,05E+05	21,42	9,41E+04	SD15spleen_cMyc+RT	565,997	22,89	3,33E+04	3,21E+04	3,21E+04	22,99	3,09E+04																																																																																																				
SD10spleen_cMyc+RT	565,997	21,31	1,01E+05	1,15E+05	1,15E+05																																																																																																																																																																																												
		20,98	1,28E+05			SD6spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD7spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD8spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD9spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD10spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD11spleen_cMyc+RT	565,997	21,76	7,37E+04	6,67E+04	6,67E+04	22,06	5,97E+04	SD12spleen_cMyc+RT	565,997	21,99	6,28E+04	5,74E+04	5,74E+04	22,26	5,20E+04	SD13spleen_cMyc+RT	565,997	22,06	5,96E+04	6,70E+04	6,70E+04	21,75	7,43E+04	SD14spleen_cMyc+RT	565,997	21,13	1,15E+05	1,05E+05	1,05E+05	21,42	9,41E+04	SD15spleen_cMyc+RT	565,997	22,89	3,33E+04	3,21E+04	3,21E+04	22,99	3,09E+04																																																																																																												
SD6spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																																													
		No Ct	No Ct			SD7spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD8spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD9spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD10spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD11spleen_cMyc+RT	565,997	21,76	7,37E+04	6,67E+04	6,67E+04	22,06	5,97E+04	SD12spleen_cMyc+RT	565,997	21,99	6,28E+04	5,74E+04	5,74E+04	22,26	5,20E+04	SD13spleen_cMyc+RT	565,997	22,06	5,96E+04	6,70E+04	6,70E+04	21,75	7,43E+04	SD14spleen_cMyc+RT	565,997	21,13	1,15E+05	1,05E+05	1,05E+05	21,42	9,41E+04	SD15spleen_cMyc+RT	565,997	22,89	3,33E+04	3,21E+04	3,21E+04	22,99	3,09E+04																																																																																																																				
SD7spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																																													
		No Ct	No Ct			SD8spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD9spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD10spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD11spleen_cMyc+RT	565,997	21,76	7,37E+04	6,67E+04	6,67E+04	22,06	5,97E+04	SD12spleen_cMyc+RT	565,997	21,99	6,28E+04	5,74E+04	5,74E+04	22,26	5,20E+04	SD13spleen_cMyc+RT	565,997	22,06	5,96E+04	6,70E+04	6,70E+04	21,75	7,43E+04	SD14spleen_cMyc+RT	565,997	21,13	1,15E+05	1,05E+05	1,05E+05	21,42	9,41E+04	SD15spleen_cMyc+RT	565,997	22,89	3,33E+04	3,21E+04	3,21E+04	22,99	3,09E+04																																																																																																																												
SD8spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																																													
		No Ct	No Ct			SD9spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD10spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD11spleen_cMyc+RT	565,997	21,76	7,37E+04	6,67E+04	6,67E+04	22,06	5,97E+04	SD12spleen_cMyc+RT	565,997	21,99	6,28E+04	5,74E+04	5,74E+04	22,26	5,20E+04	SD13spleen_cMyc+RT	565,997	22,06	5,96E+04	6,70E+04	6,70E+04	21,75	7,43E+04	SD14spleen_cMyc+RT	565,997	21,13	1,15E+05	1,05E+05	1,05E+05	21,42	9,41E+04	SD15spleen_cMyc+RT	565,997	22,89	3,33E+04	3,21E+04	3,21E+04	22,99	3,09E+04																																																																																																																																				
SD9spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																																													
		No Ct	No Ct			SD10spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct		No Ct	No Ct	SD11spleen_cMyc+RT	565,997	21,76	7,37E+04	6,67E+04	6,67E+04	22,06	5,97E+04	SD12spleen_cMyc+RT	565,997	21,99	6,28E+04	5,74E+04	5,74E+04	22,26	5,20E+04	SD13spleen_cMyc+RT	565,997	22,06	5,96E+04	6,70E+04	6,70E+04	21,75	7,43E+04	SD14spleen_cMyc+RT	565,997	21,13	1,15E+05	1,05E+05	1,05E+05	21,42	9,41E+04	SD15spleen_cMyc+RT	565,997	22,89	3,33E+04	3,21E+04	3,21E+04	22,99	3,09E+04																																																																																																																																												
SD10spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct																																																																																																																																																																																													
		No Ct	No Ct			SD11spleen_cMyc+RT	565,997	21,76	7,37E+04	6,67E+04	6,67E+04	22,06	5,97E+04	SD12spleen_cMyc+RT	565,997	21,99	6,28E+04	5,74E+04	5,74E+04	22,26	5,20E+04	SD13spleen_cMyc+RT	565,997	22,06	5,96E+04	6,70E+04	6,70E+04	21,75	7,43E+04	SD14spleen_cMyc+RT	565,997	21,13	1,15E+05	1,05E+05	1,05E+05	21,42	9,41E+04	SD15spleen_cMyc+RT	565,997	22,89	3,33E+04	3,21E+04	3,21E+04	22,99	3,09E+04																																																																																																																																																				
SD11spleen_cMyc+RT	565,997	21,76	7,37E+04	6,67E+04	6,67E+04																																																																																																																																																																																												
		22,06	5,97E+04			SD12spleen_cMyc+RT	565,997	21,99	6,28E+04	5,74E+04	5,74E+04	22,26	5,20E+04	SD13spleen_cMyc+RT	565,997	22,06	5,96E+04	6,70E+04	6,70E+04	21,75	7,43E+04	SD14spleen_cMyc+RT	565,997	21,13	1,15E+05	1,05E+05	1,05E+05	21,42	9,41E+04	SD15spleen_cMyc+RT	565,997	22,89	3,33E+04	3,21E+04	3,21E+04	22,99	3,09E+04																																																																																																																																																												
SD12spleen_cMyc+RT	565,997	21,99	6,28E+04	5,74E+04	5,74E+04																																																																																																																																																																																												
		22,26	5,20E+04			SD13spleen_cMyc+RT	565,997	22,06	5,96E+04	6,70E+04	6,70E+04	21,75	7,43E+04	SD14spleen_cMyc+RT	565,997	21,13	1,15E+05	1,05E+05	1,05E+05	21,42	9,41E+04	SD15spleen_cMyc+RT	565,997	22,89	3,33E+04	3,21E+04	3,21E+04	22,99	3,09E+04																																																																																																																																																																				
SD13spleen_cMyc+RT	565,997	22,06	5,96E+04	6,70E+04	6,70E+04																																																																																																																																																																																												
		21,75	7,43E+04			SD14spleen_cMyc+RT	565,997	21,13	1,15E+05	1,05E+05	1,05E+05	21,42	9,41E+04	SD15spleen_cMyc+RT	565,997	22,89	3,33E+04	3,21E+04	3,21E+04	22,99	3,09E+04																																																																																																																																																																												
SD14spleen_cMyc+RT	565,997	21,13	1,15E+05	1,05E+05	1,05E+05																																																																																																																																																																																												
		21,42	9,41E+04			SD15spleen_cMyc+RT	565,997	22,89	3,33E+04	3,21E+04	3,21E+04	22,99	3,09E+04																																																																																																																																																																																				
SD15spleen_cMyc+RT	565,997	22,89	3,33E+04	3,21E+04	3,21E+04																																																																																																																																																																																												
		22,99	3,09E+04																																																																																																																																																																																														

SD11spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct	
		No Ct	No Ct		
SD12spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct	
		No Ct	No Ct		
SD13spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct	
		No Ct	No Ct		
SD14spleen_cMyc-RT	562,755	No Ct	No Ct	No Ct	
		No Ct	No Ct		
SD15spleen_cMyc-RT	562,755	36,15	2,86E+00	2,86E+00	
		No Ct	No Ct		
SD16spleen_cMyc+RT	691,322	22,97	3,13E+04	3,91E+04	3,91E+04
		22,40	4,69E+04		
SD17spleen_cMyc+RT	691,322	22,24	5,27E+04	5,83E+04	5,83E+04
		21,96	6,40E+04		
SD18spleen_cMyc+RT	691,322	21,70	7,71E+04	7,99E+04	7,99E+04
		21,60	8,28E+04		
SD19spleen_cMyc+RT	691,322	21,90	6,69E+04	7,22E+04	7,22E+04
		21,69	7,75E+04		
SD20spleen_cMyc+RT	691,322	21,99	6,27E+04	6,25E+04	6,25E+04
		22,00	6,24E+04		
SD16 -RT cmyc	846,924	31,68	7,34E+01	No Ct	
		31,65	7,51E+01		
SD17 -RT cmyc	846,924	32,68	3,63E+01	No Ct	
		33,43	2,13E+01		
SD18 -RT cmyc	846,924	29,60	3,19E+02	No Ct	
		29,60	3,19E+02		
SD19 -RT cmyc	846,924	31,78	6,86E+01	No Ct	
		33,10	2,70E+01		
SD20 -RT cmyc	846,924	34,74	8,52E+00	No Ct	
		31,46	8,58E+01		
SD21spleen_cMyc+RT	691,322	22,19	5,47E+04	5,67E+04	5,67E+04
		22,08	5,87E+04		
SD22spleen_cMyc+RT	691,322	22,71	3,79E+04	3,25E+04	3,25E+04
		23,18	2,71E+04		
SD23spleen_cMyc+RT	691,322	21,22	1,08E+05	1,20E+05	1,20E+05
		20,94	1,32E+05		
SD24spleen_cMyc+RT	691,322	20,77	1,49E+05	1,29E+05	1,29E+05
		21,21	1,09E+05		
SD25spleen_cMyc+RT	691,322	22,71	3,79E+04	4,48E+04	4,48E+04
		22,26	5,18E+04		
SD21 -RT cmyc	552,181	33,65	1,84E+01	No Ct	
		33,94	1,50E+01		
SD22 -RT cmyc	552,181	35,11	6,55E+00	No Ct	
		36,35	2,72E+00		
SD23 -RT cmyc	552,181	34,98	7,17E+00	No Ct	
		34,95	7,34E+00		
SD24 -RT cmyc	552,181	34,64	9,11E+00	No Ct	
		35,58	4,70E+00		
SD25 -RT cmyc	552,181	36,34	2,75E+00	No Ct	
		34,06	1,38E+01		
SD26spleen_cMyc+RT	691,322	24,26	1,26E+04	1,26E+04	1,26E+04
		24,28	1,25E+04		
SD27spleen_cMyc+RT	691,322	24,92	7,92E+03	8,38E+03	8,38E+03
		24,77	8,84E+03		
SD28spleen_cMyc+RT	691,322	24,23	1,29E+04	1,45E+04	1,45E+04
		23,93	1,60E+04		

SD29spleen_cMyc+RT	691,322	22,85	3,41E+04	3,78E+04	3,78E+04
		22,58	4,14E+04		
SD30spleen_cMyc+RT	691,322	20,61	1,66E+05	1,80E+05	1,80E+05
		20,39	1,94E+05		
SD26-RT	1226,814	35,88	3,80E+00	No Ct	
		No Ct	No Ct		
SD27-RT	1226,814	35,13	6,44E+00	No Ct	
		34,85	7,88E+00		
SD28-RT	1226,814	34,54	9,76E+00	No Ct	
		34,96	7,28E+00		
SD29-RT	1226,814	36,02	3,45E+00	No Ct	
		35,18	6,22E+00		
SD30-RT	1226,814	34,40	1,08E+01	No Ct	
		34,54	9,80E+00		
SD31spleen_cMyc+RT	691,322	23,64	1,96E+04	2,09E+04	2,09E+04
		23,46	2,22E+04		
SD32spleen_cMyc+RT	691,322	22,44	4,56E+04	4,63E+04	4,63E+04
		22,40	4,71E+04		
SD33spleen_cMyc+RT	691,322	24,41	1,14E+04	1,24E+04	1,24E+04
		24,18	1,34E+04		
SD34spleen_cMyc+RT	691,322	22,57	4,15E+04	4,22E+04	4,22E+04
		22,53	4,29E+04		
SD35spleen_cMyc+RT	691,322	25,32	6,01E+03	6,37E+03	6,37E+03
		25,15	6,74E+03		

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Hypothese.....	17
Abb. 2: Schematischer Aufbau der Blotting Apparatur zur Durchführung des Southern Blots..	40
Abb. 3: Schematische Darstellung zur Herstellung rekombinanter Viren..	51
Abb. 4: <i>Hind</i> III-Restriktionsverdau der Viren RCMV-wt, RCMV- Δ CD200 und RCMV- revCD200.....	52
Abb. 5: Schematischer RCMV-E Restriktionsverdau und Darstellung vCD200-umgebender ORF's.	52
Abb. 6: Southern Blot zum Nachweis des vCD200- bzw. lacZ-Gens.	53
Abb. 7: Wachstumskurve bei hoher MOI (5)..	55
Abb. 8: Wachstumskurve bei niedriger MOI (0.01).	55
Abb. 9: Nachweis der vCD200-Expression nach Infektion..	57
Abb. 10 Titration des CD200R-bio Antikörpers..	58
Abb. 11: Cytospins unstimulierter und mit LPS stimulierter Makrophagen..	59
Abb. 12: Western Blot von Makrophagen-Lysaten zum Nachweis von iNOS. t.....	60
Abb. 13: Überprüfung der Expression von CD200R auf der Makrophagenzelllinie nach Stimulation.	61
Abb. 14: Western Blot von Lysaten einer Makrophagen/REF co-Kultur nach Infektion..	62
Abb. 15: Versuchsübersicht und verwendetes Probenmaterial.	64
Abb. 16: Durchflusszytometrische Analyse der PEZ mit dem Makrophagenmarker OX41-PE..	65
Abb. 17: Färbung von stimulierten und unstimulierten PEZ mit dem α -iNOS Alexa 488- Antikörper.....	66
Abb. 18: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen der PEZ zwei Tage nach der Infektion.	68
Abb. 19: TaqMan-PCR Standardgerade für das Gen iNOS.	70
Abb. 20: Effizienz der etablierten Ein-Schritt-cDNA-Synthese im Vergleich zum Standard- Protokoll.	71
Abb. 21: Vergleich der Effizienz der PCR nach einem zweiten DNase-Verdau.....	72
Abb. 22: Quantitative Bestimmung der Viruslast in der Milz.....	74
Abb. 23: Quantitative Bestimmung der Gentranskription von CD200, vCD200, iNOS und CD200R in der Milz.....	75
Abb. 24: Quantitative Bestimmung der Gentranskription von CD200, vCD200, iNOS und CD200R in peritonealen Makrophagen.....	76
Abb. 25: Immunhistochemische iNOS-Färbung in der Milz.	78
Abb. 26: Immunhistochemische MHC-Klasse-II-Färbung Milz.	79

10 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht der charakteristischen Vertreter der Herpesviren bei Mensch und Tier.....	9
Tab. 2: Übersicht der viralen CD200-Homologe	15
Tab. 3: Verwendete Antikörper	23
Tab. 4: Verwendete Plasmide.....	24
Tab. 5: Verwendete Primer.....	25
Tab. 6: Verwendete TaqMan Sonden	26
Tab. 7: Pipettierschema cDNA-Synthese.....	32
Tab. 8: PCR-Programm Drei-Schritt cDNA-Synthese	33
Tab. 9: PCR-Programm Ein-Schritt cDNA-Synthese.....	33
Tab. 10: Standard PCR Pipettierschema	34
Tab. 11: Standard PCR Programm.....	34
Tab. 12: Pipettierschema TOPO-Ligation	36
Tab. 13: Pipettierschema für einen Restriktionsverdau mit <i>EcoRI</i>	39
Tab. 14: Pipettierschema für einen Sequenzierungsansatz	42
Tab. 15: Programm für die Sequenzierungs-PCR.....	42
Tab. 16: Pipettierschema für ein 7% Trenn- und 4 % Sammelgel.....	44
Tab. 17: Versuchsgruppen-Übersicht	49
Tab. 18: Durchgeführte Versuche mit dem Probenmaterial aus den Tieren.....	50
Tab. 19: Ergebnisse der Virustitration aus der Leber und Milz 2d p.i.	73

11 Abkürzungsverzeichnis

Chemikalien und Lösungen

APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FKS	Fötale Kälberserum
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MgCl	Magnesiumchlorid
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxyd
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard Saline Citrat
TAE	Trisacetat-EDTA
TEMED	N, N, N', N-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

Molekularbiologische Abkürzungen

Ak	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
cDNA	komplementäre DNA
CD200R	CD200-Rezeptor
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
gB	Glykoprotein B
HRP	horseradish peroxidase
IgSF	Immunglobulinsuperfamilie
IgG	Immunglobulin G
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
λ	Lambda
MCS	Multiple Cloning Site
MHC	Major Histocompatibility Complex
mAk	monoklonaler Antikörper
mRNA	messenger-RNA

NO	Stickstoffmonoxid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
O	Sauerstoff
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
pAk	polyklonaler Antikörper
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PEZ	Peritoneale Exsudatzellen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
vCD200	virales CD200-Homolog

Viren

CMV	Cytomegalovirus
HCMV	humanes Cytomegalovirus
MCMV	Murines Cytomegalovirus
RCMV	Ratten-Cytomegalovirus
RCMV-E	England Isolat des RCMV
RCMV-M	Maastricht Isolat des RCMV
RCMV- Δ CD200	RCMV CD200-Deletionsmutante des RCMV-E Wildtyp
RCMV-revCD200	RCMV CD200-Revertante zu RCMV- Δ CD200
RCMV-wt	RCMV-E Wildtyp-Virus

Technische Einheiten und Messgrößen

abs.	absolut (100 %)
ad.	auffüllen bis
b	Base
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung
h	Stunden
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	molar
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	millimolar
mmol	Millimol
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
min	Minuten
mol	Mol
ng	Nanogramm
nm	Nanometer

pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden
T _m	Schmelztemperatur
U	Unit (Enzymeinheit)
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumen per Volumen
w/v	Gewicht per Volumen
%	Prozent

Allgemeine Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
<i>et al.</i>	und andere
FL1-H	Fluoreszenzkanal 1
FL2-H	Fluoreszenzkanal 2
mock-infiziert	nicht infiziert
p.s.	post Stimulation
REF	Rattenembryofibroblasten
s.	siehe
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
Tabl.	Tablette
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

12 Literaturverzeichnis

- Alcami, A.; Ghazal, P.; Yewdell, J. W. (2002):
Viruses in control of the immune system. Workshop on molecular mechanisms of immune modulation: lessons from viruses.
EMBO Rep. 3(10), 927-932.
- Alcami, A.; Koszinowski, U. H. (2000):
Viral mechanisms of immune evasion.
Trends Microbiol. 8(9), 410-418.
- Andersson-Anvret, M.; Forsby, N.; Klein, G.; Henle, W. (1977):
Relationship between the Epstein-Barr virus and undifferentiated nasopharyngeal carcinoma: correlated nucleic acid hybridization and histopathological examination.
Int J Cancer. 20(4), 486-494.
- Arens, R.; Wang, P.; Sidney, J.; Loewendorf, A.; Sette, A.; Schoenberger, S. P.; Peters, B.; Benedict, C. A. (2008):
Cutting edge: murine cytomegalovirus induces a polyfunctional CD4 T cell response.
J Immunol. 180(10), 6472-6476.
- Baca Jones C.C.; Kreklywich C.N.; Messaoudi I.; Vomaska J.; McCartney E.; Orloff S.L.; Nelson J.A.; Streblow D.N. (2009):
Rat cytomegalovirus infection depletes MHC II in bone marrow derived dendritic cells.
Virology.388(1):78-90.
- Barclay, A. N. (1981):
The localization of populations of lymphocytes defined by monoclonal antibodies in rat lymphoid tissues.
Immunology. 42(4):593-600.
- Barclay, A. N.; Wright, G. J.; Brooke, G.; Brown, M. H. (2002):
CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells.
Trends Immunol. 23(6), 285-290.
- Birnboim, H. C.; Doly, J. (1979):
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucleic Acids Res. 7(6), 1513-1523.
- Borchers, K.; Frölich, K. (1997):
Antibodies against equine herpesviruses in free-ranging mountain zebras from Namibia.
J Wildl Dis. 33(4), 812-817.
- Borst E.M.; Benkartek C.; Messerle M. (2007):
Use of bacterial artificial chromosomes in generating targeted mutations in human and mouse cytomegaloviruses.
Curr Protoc Immunol., Chapter 10:Unit 10.32.

- Britt, W. u. C. A. (1996):
Cytomegalovirus.
Fields Virology. 3rd. ed, 2494-2496.
- Bruggemann, C. G.; Boven CPA (1985):
Susceptibility of peritoneal macrophages to rat cytomegalovirus infection.
FEMS Microbiological Letters. 263-266.
- Burns, W. H.; Barbour, G. M.; Sandford, G. R. (1988):
Molecular cloning and mapping of rat cytomegalovirus DNA.
Virology. 166(1), 140-148.
- Cameron, C. M.; Barrett, J. W.; Liu, L.; Lucas, A. R.; McFadden, G. (2005):
Myxoma virus M141R expresses a viral CD200 (vOX-2) that is responsible for down-regulation of macrophage and T-cell activation in vivo.
J Virol. 79(10), 6052-6067.
- Cameron C. M.; Hota-Mitchell S; Chen L., Barrett J; Cao J. X.; Macaulay C.; Willer D.; Evans D.; McFadden G. (1999):
The complete DNA sequence of myxoma virus.
Virology. 264(2):298-318.
- Chang, Y.; Cesarman, E.; Pessin, M. S.; Lee, F.; Culpepper, J.; Knowles, D. M.; Moore, P. S. (1994):
Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma.
Science. 266(5192), 1865-1869.
- Copland, D. A.; Calder, C. J.; Raveney, B. J.; Nicholson, L. B.; Phillips, J.; Cherwinski, H.; Jenmalm, M.; Sedgwick, J. D.; Dick, A. D. (2007):
Monoclonal antibody-mediated CD200 receptor signaling suppresses macrophage activation and tissue damage in experimental autoimmune uveoretinitis.
Am J Pathol. 171(2), 580-588.
- Edington, N.; Plowright, W.; Watt, R. G. (1976):
Generalized porcine cytomegalic inclusion disease: distribution of cytomegalic cells and virus.
J Comp Pathol. 86(2), 191-202.
- Ehlers, B.; Dural, G.; Marschall, M.; Schregel, V.; Goltz, M.; Hentschke, J. (2006):
Endotheliotropic elephant herpesvirus, the first betaherpesvirus with a thymidine kinase gene.
J Gen Virol. 87(Pt 10), 2781-2789.
- Ehlers, B.; Dural, G.; Yasmum, N.; Lembo, T.; de Thoisy, B.; Ryser-Degiorgis, M. P.; Ulrich, R. G.; McGeoch, D. J. (2008):
Novel mammalian herpesviruses and lineages within the Gammaherpesvirinae: cospeciation and interspecies transfer.
J Virol. 82(7), 3509-3516.
- Enders, G.; Bäder, U.; Bartelt, U.; Daiminger, A. (2003):
Zytomegalovirus-(CMV) Durchseuchung und Häufigkeit von CMV-Primärinfektionen bei schwangeren Frauen in Deutschland.
Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz. 46 (5), 426-432.

- Engels, W.; Grauls, G.; Lemmens, P. J.; Mullers, W. J.; Bruggeman, C. A. (1989):
Influence of a cytomegalovirus infection on functions and arachidonic acid metabolism of rat peritoneal macrophages.
J Leukoc Biol. 45(5), 466-473.
- Foster-Cuevas, M.; Westerholt, T.; Ahmed, M.; Brown, M.H.; Barclay, A.N.; Voigt, S. (2011):
Cytomegalovirus e127 Protein Interacts with the Inhibitory CD200 Receptor.
J Virol. 85(12), 6055-6059.
- Foster-Cuevas, M.; Wright, G. J.; Puklavec, M. J.; Brown, M. H.; Barclay, A. N. (2004):
Human herpesvirus 8 K14 protein mimics CD200 in down-regulating macrophage activation through CD200 receptor.
J Virol. 78(14), 7667-7676.
- Gompels, U. A.; Nicholas, J.; Lawrence, G.; Jones, M.; Thomson, B. J.; Martin, M. S.; Efstathiou, S.; Craxton, M.; Macaulay, H. A. (1995):
The DNA sequence of human herpesvirus-6: structure, coding content, and genome evolution.
Virology 209, 29.-51
- Graham, F. L.; van der Eb, A. J. (1973)
A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA.
Virology. 52(2), 456-467.
- Hassink, G. C.; Duijvestijn-van Dam, J. G.; Koppers-Lalic, D.; van Gaans-van den Brink, J.; van Leeuwen, D.; Vink, C.; Bruggeman, C. A.; Wiertz, E. J. (2005):
Rat cytomegalovirus induces a temporal downregulation of major histocompatibility coangernplex class I cell surface expression
Viral Immunol. 18(4), 607-615.
- Hatherley, D.; Barclay, A. N. (2004):
The CD200 and CD200 receptor cell surface proteins interact through their N-terminal immunoglobulin-like domains.
Eur J Immunol. 34(6), 1688-1694.
- Heid, C. A.; Stevens, J.; Livak, K. J.; Williams, P. M. (1996):
Real time quantitative PCR.
Genome Res. 6(10), 986-994.
- Heinritzi, K. G., Rudolf, H.; Reiner, G.; Schnurrbusch, U. (2006):
"Schweinekrankheiten."
Verlag: Utb
- Hess, M.; Blöcker, H.; Brandt, P. (1997):
The Complete Nucleotide Sequence of the Egg Drop Syndrome Virus: An Intermediate between Mastadenoviruses and Aviadenoviruses.
Virology 238, 145–156
- Hillebrands, J. L.; van der Werf, N.; Klatter, F. A.; Bruggeman, C. A.; Rozing, J. (2003):
Role of peritoneal macrophages in cytomegalovirus-induced acceleration of autoimmune diabetes in BB-rats.
Clin Dev Immunol. 10(2-4), 133-139.

Hoek, R. M.; Ruuls, S. R.; Murphy, C. A.; Wright, G. J.; Goddard, R.; Zurawski, S. M.; Blom, B.; Homola, M. E.; Streit, W. J.; Brown, M. H.; Barclay, A. N.; Sedgwick, J. D. (2000): Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science*. 290(5497), 1768-1771.

Janeway, Charles A. jr.; Walport, M; Shlomchik (2002): *Immunologie*
Spektrum Akademischer Verlag. 5. Auflage, 42-44, 123-126.

Jenmalm, M. C.; Cherwinski, H.; Bowman, E. P.; Phillips, J. H.; Sedgwick, J. D. (2006): Regulation of myeloid cell function through the CD200 receptor. *J Immunol*. 176(1), 191-199.

Kretz-Rommel, A.; Qin, F.; Dakappagari, N.; Ravey, E. P.; McWhirter, J.; Oltean, D.; Frederickson, S.; Maruyama, T.; Wild, M. A.; Nolan, M. J.; Wu, D.; Springhorn, J.; Bowdish, K. S. (2007): CD200 expression on tumor cells suppresses antitumor immunity: new approaches to cancer immunotherapy. *J Immunol*. 178(9), 5595-5605.

Langlais, C. L.; Jones, J. M.; Estep, R. D.; Wong, S. W. (2006): Rhesus Rhadinovirus R15 Encodes a Functional Homologue of Human CD200. *J Virol*. 80(6): 3098–3103.

Lee, H. J.; Essani, K.; Smith, G. L. (2001): The Genome Sequence of Yaba-like Disease Virus, a Yatapoxvirus. *Virology* 281, 170±192

Macasaet, F. F.; Holley, K. E.; Smith, T. F.; Keys, T. F. (1975): Cytomegalovirus studies of autopsy tissue. II. Incidence of inclusion bodies and related pathologic data. *Am J Clin Pathol*. 63(6), 859-865.

Meuth, S. G.; Simon, O. J.; Grimm, A.; Melzer, N.; Herrmann, A. M.; Spitzer, P.; Landgraf, P.; Wiendl, H. (2008): CNS inflammation and neuronal degeneration is aggravated by impaired CD200-CD200R-mediated macrophage silencing. *J Neuroimmunol*. 194(1-2), 62-69.

Messerle, M.; Crnkovic, I.; Hammerschmidt, W; Ziegler, H.; Koszinowski, U. H. (1997): Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(26):14759-14763.

Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 51 Pt 1, 263-273.

Nicholas, J. (1996): Determination and analysis of the complete nucleotide sequence of human herpesvirus. *J. Virol*. 70:5975.-5989

- Pollock, J. L.; Presti, R. M.; Paetzold, S.; Virgin, H. W. t. (1997):
Latent murine cytomegalovirus infection in macrophages.
Virology. 227(1), 168-179.
- Preston, S.; Wright, G. J.; Starr, K.; Barclay, A. N.; Brown, M. H. (1997):
The leukocyte/neuron cell surface antigen OX2 binds to a ligand on macrophages.
Eur J Immunol. 27(8), 1911-1918.
- Rabson, A. S.; Edgcomb, J. H.; Legallais, F. Y.; Tyrrell, S. A. (1969):
Isolation and growth of rat cytomegalovirus in vitro.
Proc Soc Exp Biol Med. 131(3), 923-937.
- Rawlinson, W. D.; Farrell, H. E.; Barrell, B. G. (1996)
Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus.
J Virol. 1996 Dec;70(12):8833-8849.
- Reddehase, M. J.; Kaptein, S.; Vink, C; Bruggeman, C.; Stassen, F. (2006):
The Rat Model for CMV Infection and Vascular Disease.
Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology, Caister Academic Press
- Reddehase, M. J.; Simon, C. O.; Seckert, C. K.; Lemmermann, N.; Grzimek, N. K.(2008):
Murine model of cytomegalovirus latency and reactivation.
Curr Top Microbiol Immunol. 2008;325:315-31.
- Redpath, S.; Angulo, A.; Gascoigne, N. R.; Ghazal, P. (1999):
Murine cytomegalovirus infection down-regulates MHC class II expression on macrophages
by induction of IL-10.
J Immunol. 162(11), 6701-6707.
- Rijkers, E. S.; de Ruiter, T.; Baridi, A.; Veninga, H.; Hoek, R. M.; Meyaard, L. (2008) :
The inhibitory CD200R is differentially expressed on human and mouse T and B
lymphocytes.
Mol Immunol. 45(4), 1126-1135.
- Russell, G. C.; Stewart, J. P.; Haig, D. M. (2009):
Malignant catarrhal fever: a review.
Vet J. 179(3):324-335.
- Russo, J. J.; Bohenzky, R. A.; Chien, M. C.; Chen, J.; Yan, M.; Maddalena, D; Parry, J. P.;
Peruzzi, D.; Edelman, I. S.; Chang, Y. (1996)
Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8).
Proc Natl Acad Sci U S A 93(25): 14862–14867
- Roizman, B.; Sears, A. (1996):
Herpes simplex viruses and their replication
Fields Virology. 3rd. ed., 2369-2370.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977):
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc Natl Acad Sci U S A. 74(12), 5463-5467.

- Sarangji, P. P.; Woo, S. R.; Rouse, B. T. (2008):
Control of viral immunoinflammatory lesions by manipulating CD200:CD200 receptor interaction.
Clin Immunol. 131(1):31-40
- Shinohara, H.; Inoue, A.; Toyama-Sorimachi, N.; Nagai, Y.; Yasuda, T.; Suzuki, H.; Horai, R.; Iwakura, Y.; Yamamoto, T.; Karasuyama, H.; Miyake, K.; Yamanashi, Y. (2005):
Dok-1 and Dok-2 are negative regulators of lipopolysaccharide-induced signaling.
J Exp Med. 201(3), 333-9.
- Smith, M. G. (1954):
Propagation of salivary gland virus of the mouse in tissue cultures.
Proc Soc Exp Biol Med. 86(3), 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(2), 424-430.
- Spaete, R. R.; Mocarski, E. S. (1987):
Insertion and deletion mutagenesis of the human cytomegalovirus genome.
Proc Natl Acad Sci U S A. 84(20), 7213-7217.
- Sweet, C. (1999):
The pathogenicity of cytomegalovirus.
FEMS Microbiol Rev. 23(4), 457-482.
- Takada, K. (2001):
Role of Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma.
Curr Top Microbiol Immunol. 258, 141-151.
- van der Strate, B. W.; Hillebrands, J. L.; Lycklama a Nijeholt, S. S.; Beljaars, L.; Bruggeman, C. A.; Van Luyn, M. J.; Rozing, J.; The, T. H.; Meijer, D. K.; Molema, G.; Harmsen, M. C. (2003):
Dissemination of rat cytomegalovirus through infected granulocytes and monocytes in vitro and in vivo.
J Virol. 77(20), 11274-11278.
- Vink, C.; Beuken, E.; Bruggeman, C. A. (2000):
Complete DNA sequence of the rat cytomegalovirus genome.
J Virol. 2000 Aug;74(16):7656-7665.
- Voigt, S.; Mesci, A.; Ettinger, J.; Fine, J. H.; Chen, P.; Chou, W.; Carlyle, J. R. (2007):
Cytomegalovirus evasion of innate immunity by subversion of the NKR-P1B:Clr-b missing-self axis.
Immunity. 26(5), 617-627.
- Voigt, S.; Sandford, G. R.; Hayward, G. S.; Burns, W. H. (2005):
The English strain of rat cytomegalovirus (CMV) contains a novel captured CD200 (vOX2) gene and a spliced CC chemokine upstream from the major immediate-early region: further evidence for a separate evolutionary lineage from that of rat CMV Maastricht.
J Gen Virol. 86(Pt 2), 263-274.

- Voigt, S., Sandford, G. R.; Ding, L.; Burns, W.H.; (2001):
Identification and characterization of a spliced C-type lectin-like gene encoded by rat cytomegalovirus.
J Virol. 2001 Jan;75(2):603-611.
- Wittwer, C. T.; Ririe, K. M.; Andrew, R. V.; David, D. A.; Gundry, R. A.; Balis, U. J. (1997):
The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control.
Biotechniques. 22(1), 176-181.
- Wright, G. J.; Puklavec, M. J.; Willis, A. C.; Hoek, R. M.; Sedgwick, J. D.; Brown, M. H.; Barclay, A. N. (2000):
Lymphoid/neuronal cell surface OX2 glycoprotein recognizes a novel receptor on macrophages implicated in the control of their function.
Immunity. 13(2), 233-242.
- Wright G. J.; Jones M. ; Puklavec M. J.; Brown M. H.; Barclay A.N. (2001):
The unusual distribution of the neuronal/lymphoid cell surface CD200 (OX2) glycoprotein is conserved in humans.
Immunology. 2001 Feb;102(2):173-9.
- Wright, G. J.; Cherwinski, H.; Foster-Cuevas, M.; Brooke, G.; Puklavec, M. J.; Bigler, M.; Song, Y.; Jenmalm, M.; Gorman, D.; McClanahan, T.; Liu, M. R.; Brown, M. H.; Sedgwick, J. D.; Phillips, J. H.; Barclay, A. N. (2003):
Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200.
J Immunol. 171(6), 3034-3046.
- Yamanishi, K.; Okuno, T.; Shiraki, K.; Takahashi, M.; Kondo, T.; Asano, Y.; Kurata, T. (1988):
Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum.
Lancet. 1(8594), 1065-1067.
- Zhang, L.; Stanford, M.; Liu, J.; Barrett, C.; Jiang, L.; Barclay, A. N.; McFadden, C. (2009):
Inhibition of macrophage activation by myxoma virus M141 protein (vCD200).
J. Virol. 83(18):9602-7
- Zola, H.; Swart, B.; Banham, A.; Barry, S.; Beare, A.; Bensussan, A.; Boumsell, L.; Buckley, C.; Bühring, H. J.; Clark, G.; Engel, P.; Fox, D.; Jin, B.Q.; Macardle, P. J.; Malavasi, F.; Mason, D.; Stockinger, H.; Yang, X. (2007):
CD molecules 2006--human cell differentiation molecules.
J Immunol Methods. 30;319(1-2):1-5

13 Publikationsverzeichnis

Foster-Cuevas, M.; Westerholt, T.; Ahmed, M.; Brown, MH.; Barclay, A.N.; Voigt, S. (2011):
Cytomegalovirus e127 Protein Interacts with the Inhibitory CD200 Receptor.
J Virol. 85(12), 6055-6059.

14 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt

Frau PD Borchers für die Übernahme der Gutachterschaft und die überaus freundliche Begleitung und Unterstützung der Arbeit von universitärer Seite.

Sebastian Voigt für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Arbeit und die Übernahme der Gutachterschaft.

Herrn Prof. Brune für die Möglichkeit meine Doktorarbeit am Fachgebiet 12 virale Infektionen des Robert Koch-Instituts anzufertigen.

Allen Mitarbeitern des Fachgebiets 12 für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielfältige Unterstützung, insbesondere Dr. Tim Finsterbusch für das Korrekturlesen.

Dem Robert Koch-Institut und seiner Leitung für die guten Arbeitsbedingungen und das inspirierende Arbeitsumfeld.

Professor Neil Barclay und seinem Lab-Team in Oxford, die Antikörper zur Verfügung gestellt haben, bei verschiedenen Fragestellungen eine große Hilfe waren und einige der Untersuchungen durchgeführt haben.

Jakob Ettinger für Rat und noch mehr Tat. Conny Hasselberg-Christoph, Lara Kutschenko, Katja Spieß und Kerstin Meyer für die Unterstützung in diversen Laborfragen.

Brigitte und Martin Dorner und ihrer Arbeitsgruppe, insbesondere Stefan Kaulfuß für die freundliche Hilfe bei den durchflusszytometrischen Messungen.

Andreas Nitsche für das Sonden- und Primerdesign und für die Diskussions-Bereitschaft bei allen aufgetretenen Problemen mit der Real time-PCR.

Frau Prof. Michaela Holdenried für ihre (wissenschaftliche) Vorbildfunktion und Südafrika.

Meinem Lehtierarzt Dr. Rainer Detering in dessen Praxis alles seinen Anfang fand für seine Freundschaft und sein Vertrauen, sowie auch seiner Familie und Katrin Niemeier: für die Unterstützung und die vielen aufbauenden und motivierenden Worte.

Meiner wunderbaren Familie und der befreundeten Wahlverwandschaft:

Meinen Freunden ohne die alles nichts wäre. Meiner Großmutter und Mutter die mir vorlebten was starke Frauen schaffen. Christine Lange besonders dafür, dass sie mir half Erwachsen zu werden und deren Offenheit und Toleranz mich befreit. Meinem Vater Rainer Westerholt für seine vielfältige Unterstützung während meines Studiums, und ohne dessen Hilfe die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

René Rasmussen for laughing and living with me, for enriching my life and sometimes even making it easier: thank you for the editing. I'm looking forward to see our latest adventure named Selma unfold and our future together!

15 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 26.9.2011

Unterschrift: Tina Westerholt