

## D. Diskussion

In dieser Arbeit wurden zunächst sensitive und spezifische Nachweismethoden zum Nachweis von HHV-6 etabliert. Dabei wurde darauf Wert gelegt, daß diese Methoden nicht nur für experimentelle Fragestellungen, sondern darüber hinaus für die klinische Diagnostik anwendbar sind. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde das Hämatopoese-Modell der NOD/SCID Maus nach Transplantation von CB-MNC optimiert. An diesem Modell wurde der Einfluß von HHV-6 auf die Bildung humaner hämatopoetischer Zellen untersucht. Da sich zeigte, daß auch nach Transplantation von CB-CD34<sup>+</sup> Zellen neben hämatopoetischen Zellen auch nicht-hämatopoetische Zellen mit stromalem Charakter in den Mäusen entstanden, wurde in einem in vitro Ansatz untersucht, ob HHV-6 die Differenzierung von CD34<sup>+</sup> Zellen zu Stroma- und Endothelzellen beeinflusst.

### I. Etablierung sensitiver Nachweismethoden für HHV-6

#### I.1 Nachweis von HHV-6 Antigenen

Der Nachweis viraler Antigene in Blutzellen oder Organschnitten gilt als Hinweis auf eine aktive Vermehrung der Viren in den untersuchten Zellen (Hebart, 1996; Schmidt, 1994). Dabei spielt eine entscheidende Rolle, ob die zu detektierenden viralen Antigene für einen Nachweis ausreichend stark exprimiert werden. Zum Nachweis von HHV-6 Antigenen in Blutzellen wurden in dieser Arbeit 10 monoklonale Antikörper (mAb) getestet. Diese mAb wurden von Prof. J. Luka zur Verfügung gestellt oder waren kommerziell erhältlich. Als Detektionsmethode der mAb diente der Nachweis über Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sekundär-Antikörper (IFA) oder die lichtmikroskopische Technik der APAAP. Nicht mit allen mAb konnten HHV-6 infizierte Zellen gleich gut identifiziert werden. Mit beiden Detektionsmethoden, IFA und APAAP, erwiesen sich die mAb H-AR-2, gp106 und H-IG-20 als besonders gut. Sie sind gegen Glykoproteine der Virushülle (H-AR-2, gp106) bzw. ein Protein des Viruskapsids gerichtet (H-IG-20). Mit den mAb H-AR-2 und H-IG-20 ließ sich sogar die unterschiedliche Lokalisation dieser Antigene in infizierten Zellen zeigen: Während H-IG-20 Signale auch im Kern infizierter Zellen detektiert werden konnten, wo das Viruskapsid assembliert wird, waren Signale mit H-AR-2 vorwiegend cytoplasmatisch. Interessanterweise konnten mit einem weiteren, gegen ein Glykoprotein gerichteten mAb (H-AR-9) keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden. Auch mit den restlichen mAb waren die erhaltenen Signale entweder nur schwach oder unspezifisch. Keiner der beiden mAb H-WL-5

und p41, die gegen frühe virale Antigene gerichtet sind, und dadurch sehr frühe Ereignisse bei der Infektion der Zelle anzeigen könnten, lieferte von der Kontrolle deutlich unterscheidbare Signale.

Monoklonale Antikörper, die im IFA keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferten, zeigten auch in der APAAP keine besseren Ergebnisse. Die Variation der Färbebedingungen, wie Fixierungsmittel, Fixierungsdauer, Dauer der mAb Inkubation und Konzentration der mAb hatten nur geringfügigen Einfluß auf die Signalbildung. Eine Erhöhung der mAb Konzentration führte zu größeren Unspezifitäten.

Wie erwartet kam es bei der APAAP verglichen mit dem IFA zu einer Signalverstärkung. In einem direkten Vergleich konnten mit der APAAP mehr HHV-6 positive Zellen detektiert werden als mit dem IFA. Leider kam es bei APPAP Färbungen auch häufig zu einem höheren Anteil von Zellen mit unspezifischen, diffusen Signalen, die die eindeutige Identifizierung schwach Antigen-positiver Zellen erschwerte. Eine weitere Signalverstärkung mit der Tyramid-Methode konnte nicht beobachtet werden.

Obwohl nach Färbung mit lichtmikroskopischen Techniken wie APAAP und TYR-Färbung die Morphologie der gefärbten Zellen noch gut zu beurteilen sein sollte, war das nicht immer der Fall. Es kam zur Kristallisation der Farbstoffe, welche eine Identifizierung bestimmter Zelltypen erschwerte. Um eindeutigere Informationen über die HHV-6 infizierten Zelltypen zu bekommen, wurden Doppelfärbungen etabliert. Ziel war die Färbung von HHV-6 Antigenen und der gleichzeitige Nachweis zelltypen-spezifischer Antigene (CD Antigene). Solch eine Doppelfärbung ist zwar auch mit lichtmikroskopischen Techniken prinzipiell möglich, jedoch ist die Analyse schwieriger als bei einer Fluoreszenzfarbstoff-basierten Doppelfärbung, bei der die einzelnen Farben getrennt analysiert und dann zu einem Bild vereinigt werden können.

Zur Fluoreszenz-basierten Doppelfärbung wurden unterschiedliche Strategien verfolgt. Grundsätzlich muß bei der Doppelfärbung die Kreuzreaktion der Fluoreszenzfarbstoff-markierten Konjugate mit den Primär-Antikörpern ausgeschlossen werden, da sonst falsch positive Signale erhalten würden. Stammen die Primär-Antikörper aus verschiedenen Spezies, so können diese mit spezies-spezifischen Antikörpern markiert werden. Die hier verwendeten mAb wurden jedoch alle in der Maus generiert. Deshalb wurde zuerst versucht, die mAb der FACS Analysen zu verwenden, da diese direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind und direkt nachgewiesen werden können. Prinzipiell konnten diese mAb mit dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (cLSM) detektiert werden, jedoch waren die Signale sehr schwach. Das läßt sich dadurch erklären, daß bei diesen mAb das

Verhältnis von Fluoreszenzfarbstoff zu Protein etwa um den Faktor 10 geringer ist, als bei mAb für die Fluoreszenz-Mikroskopie. Um das Signal FITC markierter FACS mAb zu verstärken, wurden FITC markierte gegen FITC gerichtete mAb eingesetzt. Mit Hilfe dieser mAb konnte eine deutliche Signalverstärkung erzielt werden. Wurde in einer Doppelfärbung der HHV-6 spezifische mAb zuerst mit einem Maus spezifischen Konjugat gefärbt, konnte darauf folgend durch die Verstärkung des FITC Signals der Zelltyp detektiert werden, ohne eine Kreuzreaktion mit dem HHV-6 mAb zu riskieren. Bei dieser Art der Doppelfärbung waren jedoch nicht alle FITC markierten mAb gleich gut geeignet. Während CD4, CD33, CD34, CD45 und CD71 spezifische mAb durch Verstärkung des FITC Signals gut nachgewiesen werden konnten, war dies bei CD3, CD14, CD46 und CD61 spezifischen mAb nicht der Fall. Eine weitere Möglichkeit der Doppelfärbung wurde durch die Biotinylierung des HHV-6 spezifischen mAb H-AR-2 geschaffen. Dieser konnte jetzt unabhängig von einem Sekundär-Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Streptavidin detektiert werden, die CD Antigene mit einem unkonjugierten Maus mAb und einem markierten Maus-spezifischen Sekundär-Antikörper. Mit dieser Methode wurden in CB-MNC Kulturen HHV-6 positive CD4, CD33 und CD71 Zellen nachgewiesen. Diese Doppelfärbung soll nun in systematischen Versuchen dazu eingesetzt werden, um zu untersuchen, ob CD34<sup>+</sup> Zellen, d.h. potentielle PHSZ, mit HHV-6 infiziert werden können.

## **I.2 Nachweis HHV-6 spezifischer Nukleinsäuren**

Der Nachweis virus-spezifischer DNA mit der PCR ist zur Zeit die schnellste Methode, auch in der klinischen Diagnostik. Darüber hinaus ist die mit der PCR erreichte Nachweisgrenze sehr niedrig. Daher wurde zuerst eine semi-nested PCR (snPCR) etabliert, welche HHV-6 DNA spezifisch nachweist und anhand der Größe des Amplifikats eine Unterscheidung der HHV-6 Varianten A und B erlaubt. In früher beschriebenen PCR Tests erfolgte die Typisierung der beiden HHV-6 Varianten durch Restriktionsverdau der Amplifikate oder deren Hybridisierung mit varianten-spezifischen Sonden. Dadurch war der experimentelle Aufwand ungleich größer. Die Nachweisgrenze der snPCR wurde mit Verdünnungsreihen von Plasmiden ermittelt und betrug 10-100 Genomäquivalente. In einer klinischen Studie wurden Periphere Blutleukozyten (PBL) von 94 Patienten vor und nach Knochenmark-Transplantation mit der snPCR untersucht (Nitsche, 2000a). Parallel wurden die gleichen PBL mit dem mAb H-AR-2 und der APAAP gefärbt. In 52% der Patienten konnte HHV-6 DNA zu einem oder mehreren Zeitpunkten nachgewiesen werden, wobei 90% der Patienten HHV-6B DNA und nur 10% der Patienten HHV-6A DNA enthielten. Diese Ergebnisse decken sich gut mit früheren

Beobachtungen (Wilborn, 1994b; Frenkel, 1994; Kadakia, 1996). Nur in 19% der Patienten war zu einem oder mehreren untersuchten Zeitpunkten HHV-6 Antigen nachweisbar. Alle Antigen positiven Patienten waren bevor sie Antigen positiv wurden auch DNA positiv. Obwohl der Antigen Nachweis weniger sensitiv ist als der DNA Nachweis, kann ein Antigen positives Ergebnis als Zeichen aktiver Virusreplikation betrachtet werden. In der Diagnostik des humanen Cytomegalievirus ist ein Antigen positiver Befund in PBL nach Knochenmark-Transplantation hinreichende Indikation einer antiviralen Therapie (Hebart, 1996). Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Bedeutung HHV-6 Antigen positiver Blutzellen in immunsupprimierten Patienten zu evaluieren.

Problematisch ist beim Nachweis der Herpesviren, daß durch die hohe Durchseuchung mit sensitiven Nachweistechiken häufig positive Ergebnisse erhalten werden können, welche jedoch nur den Zustand der Latenz widerspiegeln. Daher sind quantitative Methoden gefordert, die in der Lage sind, Entwicklungen zu messen, d.h. die Zunahme oder Abnahme der Viruslast im Verlauf einer Erkrankung oder Therapie. Mit der Möglichkeit der Nutzung eines ABI Prism 7700 Thermocyclers, wurde ein Test zum quantitativen Nachweis von HHV-6 DNA entwickelt. Grundlage dieser Echt-Zeit PCR Tests ist die Messung der Anzahl der gebildeten Amplifikate während der PCR Reaktion, d.h. es handelt sich um eine On-Line Messung (Heid, 1996). Im Gegensatz zu konventionellen PCR Tests erfolgt die Quantifizierung bei Echt-Zeit Messungen in der exponentiellen Phase der PCR und nicht nach einer definierten Anzahl von PCR Zyklen. In der exponentiellen Phase kann eine direkte Beziehung zwischen der eingesetzten DNA Menge und dem gebildeten Signal erstellt werden, was in der Plateau-Phase der PCR nicht mehr gegeben ist. Echt-Zeit PCR Quantifizierungen sind deshalb sehr genau. Darüber hinaus erfordert die Echt-Zeit PCR keine post-PCR Analyse und beugt deshalb Kontaminationen durch PCR Produkte vor. Durch die On-Line Analyse führt die Echt-Zeit PCR extrem schnell zu Ergebnissen.

Der in dieser Arbeit entwickelte Echt-Zeit PCR Test zum quantitativen Nachweis von HHV-6 DNA dauert 100 Minuten. Er weist HHV-6 DNA in einem linearen Bereich von  $10^1$ - $10^7$  Genomäquivalenten nach und ist so konstruiert, daß parallel HHV-6A und HHV-6B detektiert werden können. Dieser Test wurde verwendet um die HHV-6 DNA Last in gepaarten Proben von PBL und Plasma von 35 Patienten nach Knochenmark-Transplantation zu messen (Nitsche, 2000b). Diese Studie bestätigte, daß in PBL HHV-6B die dominante Variante ist. HHV-6A konnte nur in den PBL eines Patienten nachgewiesen werden. Im Plasma dagegen ist HHV-6A die dominante Variante, wobei die Viruslast höher ist als die von HHV-6B. Offensichtlich scheint HHV-6A nicht in PBL zu replizieren. Dieses Ergebnis ist sehr

interessant, da beide HHV-6 Varianten A und B in der Lunge von Gesunden nachgewiesen werden konnten, während im Plasma gesunder Blutspender nur vereinzelt HHV-6 DNA nachweisbar ist (Cone, 1996; Nitsche, 2000b). Obwohl bislang keine Erkrankung mit HHV-6A assoziiert werden konnte, scheint diese Variante ebenso latent im Körper zu persistieren und unter Immunsuppression reaktiviert zu werden. Dieses ist ein weiterer Hinweis darauf, daß die beiden HHV-6 Varianten A und B unterschiedliches Verhalten bezüglich des Zell-Tropismus und des pathogenen Potentials zu haben scheinen. Weitere Studien werden zeigen, wo die unterschiedlichen HHV-6 Varianten im Körper persistieren und unter welchen Bedingungen es zu einer Reaktivierung kommt.

Der Nachweis von HHV-6 spezifischer RNA gestaltete sich schwierig. Als größtes Problem entpuppte sich dabei die Präparation der RNA. War die RNA nicht absolut DNA frei, kam es zur Amplifikation kontaminierender HHV-6 DNA und man erhielt falsch positive Ergebnisse. Da das HHV-6A Genom nur über drei kleine Introns verfügt (das HHV-6B Genom war zu dieser Zeit noch nicht vollständig bekannt), war die Konstruktion Intron-überlappender Primer zur ausschließlichen Amplifikation von cDNA sehr schwierig. Obwohl mit der HHV-6 RT-PCR eine Nachweismethode für HHV-6 RNA etabliert werden konnte, war deren Nachweisgrenze jedoch sehr hoch. In Patienten nach Knochenmark-Transplantation konnte damit keine HHV-6 RNA nachgewiesen werden. Für den Nachweis einer aktiven Virusreplikation scheint deshalb die quantitative DNA PCR geeigneter zu sein.

## **II. Infektiosität und Pathogenität von HHV-6 für die NOD/SCID Maus**

Wesentliche Voraussetzung zur Durchführung dieser Arbeit war, den Einfluß von HHV-6 auf die NOD/SCID Maus zu ermitteln. Da Herpesviren streng spezies-spezifisch sind, war nicht davon auszugehen, daß HHV-6 pathogenes Potential für die NOD/SCID Maus besitzen würde. Für HHV-6A konnte bislang lediglich gezeigt werden, daß es *in vitro* in Zellen zweier Affenarten (*macaca nemestrina* und *pan troglodytes*) repliziert (Lusso, 1994; Lusso, 1990). Vom Cytomegalievirus kennt man sowohl eine humane (HCMV) als auch eine murine (MCMV) Spezies. HCMV kann in murine Zellen eindringen, dort jedoch nicht replizieren. Ein dem HHV-6 homologes murines Herpesvirus ist zur Zeit nicht bekannt. Um homologe murine Herpesviren in NOD/SCID Mäusen zu identifizieren, wurden Knochenmark und Organe mit einer PCR untersucht, die insgesamt 16 Herpesviren detektieren kann (Ehlers, 1999). Dies geschah in der Arbeitsgruppe von Dr. B. Ehlers, Robert Koch-

Institut Berlin, welche sich mit virusbedingten Risiken bei Xeno-Transplantationen beschäftigt. In keiner der 5 untersuchten NOD/SCID Mäuse konnte DNA von Herpesviren nachgewiesen werden. Ein murines HHV-6 Homolog, welches selbst Einfluß auf die Chimären-Hämatopoese haben könnte, scheint in diesen Mäusen nicht zu existieren.

Daraufhin wurden NOD/SCID Mäusen HHV-6-haltige Zellkultur-Überstände oder HHV-6 infizierte Zellen injiziert. Bei der Sektion nach 2, 4 und 8 Wochen konnten keine pathologischen Veränderungen verglichen mit Kontrollmäusen bemerkt werden. Auch das Blutbild dieser Mäuse war unverändert. Der Anteil DNA positiver Organe nahm mit zunehmender Zeit nach der Injektion ab. Ein Tropismus für bestimmte Organe war ebenfalls nicht zu bemerken. Es muß davon ausgegangen werden, daß die HHV-6 Partikel durch die Zirkulation im Körper verteilt werden und dort, ohne sich zu vermehren, langsam desintegrieren. Infektiöse HHV-6 Partikel konnten durch Ko-Kultivierung mit stimulierten CB-MNC nicht aus Knochenmarkzellen dieser Mäuse isoliert werden. Die Infektion von Knochenmark-Langzeitkulturen von NOD/SCID Mäusen gelang nicht, ebenso wie die Infektion zweier muriner Zelllinien nicht möglich war.

Als möglicher HHV-6 Rezeptor auf humanen Zellen wird CD46 diskutiert (Santoro, 1999). Dieser, auf allen kernhaltigen Zellen exprimierter Rezeptor, existiert ebenfalls bei der Maus. Die Homologie zum humanen CD46 beträgt auf DNA Ebene 62%, auf Protein Ebene 45% (Tsujimura, 1998). In beiden Spezies ist CD46 an der Komplementaktivierung beteiligt. Möglicherweise ist die Ähnlichkeit des murinen CD46 Moleküls nicht einmal ausreichend um HHV-6 Partikel zu binden. So konnte gezeigt werden, daß HHV-6 resistente Nagerzellen erst nach Transfektion mit humanem CD46 HHV-6 Partikel in die Zelle aufnehmen konnten, eine Virusreplikation wurde jedoch nicht festgestellt (Santoro, 1999).

Diese hier gezeigten Ergebnisse zeigen, daß HHV-6 wie erwartet nicht pathogen für die NOD/SCID Maus ist und nicht in murinen Zellen repliziert.

### **III. Etablierung des Hämatopoese-Modells der NOD/SCID Maus**

Nachdem der Einsatz immundefizienter Mäuse die Möglichkeit eröffnet hat, die humane Hämatopoese und humane PHSZ in einem *in vivo* Modell zu untersuchen, wurde eine Reihe immundefizienter Maus-Stämme entwickelt (van der Loo, 1998; McCune, 1988; McBride, 1999; Greiner, 1998). Allen gemein ist ein möglichst defizientes eigenes Immunsystem, um humane Zellen zu tolerieren und deren Entwicklung nicht zu beeinträchtigen. Die in dieser Arbeit verwendete NOD/SCID

Maus ist defizient in T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen, sowie partiell eingeschränkt in der Monozytenfunktion und Komplement-Funktion. NOD/SCID Mäuse erlauben die Bildung höherer Anteile humaner Zellen als SCID Mäuse. Mittlerweile ist durch die Kreuzung der  $\beta_2m$ -null Maus mit der NOD/SCID Maus eine immundefiziente Maus entwickelt worden, die keine NK-Zellen bildet und kein MHC-I exprimiert. Diese Mäuse versprechen nach Transplantation von peripheren Blutstammzellen ein 5-fach höheres Engraftment humaner Zellen im Knochenmark als es in NOD/SCID Mäusen stattfindet (Kollet, 2000). Wie erste Ergebnisse zeigen, ist ihr Nutzen jedoch durch eine erhöhte Radiosensitivität und die häufige Bildung von Thymus-Lymphomen eingeschränkt (Christianson, 1997).

### **III.1 Nachweis humaner Zellen in der NOD/SCID Maus**

Der Nachweis humaner Zellen in Organen der Maus erfolgte mit der FACS Analyse, der Immuncytochemischen Färbung (POX) oder der PCR. Die FACS Analyse führt schnell zu Ergebnissen und erlaubt eine genaue Quantifizierung. Abhängig vom gewählten mAb ist die Identifizierung humaner Zellen spezifisch. Ein großer Vorteil ist die mögliche Typisierung der Zellen mit der FACS Analyse. So können routinemäßig 2-3 Zell-spezifische Antigene an der selben Zellprobe untersucht werden (Herzenberg, 2000). Allerdings muß die Probe frisch sein und aus einem Organ stammen, welches eine einfache Vereinzelnung der zu untersuchenden Zellen zuläßt. Organe wie Leber und Milz sind schlecht für eine FACS Analyse geeignet, die Zellen lassen sich nur schwer vereinzeln und eine spezifische Färbung ist schwierig. Wie an Kryoschnitten der Milz gezeigt werden konnte, kann die Vereinzelnung der Zellen zu einer Abreicherung bestimmter Zelltypen führen und die Ergebnisse verfälschen.

Mit wesentlich höherem experimentellen Aufwand ist die immuncytochemische Analyse verbunden. Gut geeignet sind Einzelzellen oder Kryoschnitte von soliden Organen, auch Paraffinschnitte können gefärbt werden. Natürlich sollten die verwendeten mAb spezifisch und die zu färbenden Einzelzellen frisch sein, schockgefrorene Organe können beliebig lange gelagert und nach Bedarf geschnitten und gefärbt werden. Großer Vorteil dieser Methode ist, daß die Morphologie und der Zustand der Zellen sehr gut beurteilt werden können. Das Risiko falsch positive Zellen zu bewerten ist dadurch geringer. Die Quantifizierung ist dagegen mühsam und in einem gewissen Rahmen subjektiv. Trotzdem war die Übereinstimmung zwischen FACS Analyse und Immuncytochemischer Analyse überraschend hoch.

Im Vergleich zu diesen immunologischen Techniken kann mit der PCR keine Typisierung der Zellen erfolgen. Es kann lediglich humane DNA im Hintergrund

muriner DNA detektiert werden. Jedoch ist die PCR für jede Art von Proben einsetzbar, aus welchen DNA extrahiert werden kann. Auch die Quantifizierung des Engraftments in soliden Organen wie Leber und Niere ist möglich. Aufgrund der hohen Sensitivität sind nur geringe Zell- oder DNA Mengen notwendig. Frühere PCR Methoden bestimmten den Anteil humaner DNA im Hintergrund muriner DNA. Durch Vergleich mit definierten Verdünnungsreihen wurde dann der Anteil humaner DNA abgeschätzt oder densitometrisch bestimmt (Mobest, 1999). In dieser Arbeit wurde das erste Mal eine Echt-Zeit PCR zur Bestimmung des Anteils humaner Zellen in chimären Mäusen etabliert, der HUmu-Test. Neben den generellen Vorteilen der Echt-Zeit PCR, profitiert diese PCR von der gleichzeitigen Bestimmung der Anzahl humaner und muriner Zellen (Nitsche, 2000c). Die Kalibrierung erfolgte dabei mit humanen und murinen Zellen vor der DNA Extraktion. Diese Strategie ist sinnvoll, da bei der DNA Extraktion auftretende Verluste mit in die Kalibrierung einbezogen werden. Der HUmu-Test ist sensitiv genug, um mit 50  $\mu$ L Blut eine wöchentliche Verlaufskontrolle durchzuführen. Im Maus-Experiment konnte eine hohe Übereinstimmung zwischen der FACS Analyse und dem HUmu-Test gezeigt werden.

### **III.2 Transplantation von CB-MNC**

Obwohl bereits gezeigt wurde, daß die Injektion von frischem, unmanipuliertem Nabelschnurblut, peripherem Blut oder Knochenmark zum Engraftment humaner Zellen in der NOD/SCID Maus führt, können durch Variation der experimentellen Bedingungen diesbezüglich große Unterschiede entstehen. Da der Anteil Maus repopulierender Zellen (SRC) in Nabelschnurblut über dem von Knochenmark liegt, und Nabelschnurblut im Gegensatz zu Knochenmark und peripherem Blut nur zu <0,1% der untersuchten Proben bereits HHV-6 infiziert ist (Daibata, 1999), wurde als Quelle der hämatopoetischen Stammzellen in dieser Arbeit Nabelschnurblut verwendet. Zuerst konnte gezeigt werden, daß es nach Transplantation von CB-MNC zu einer Multiliniien-Hämatopoese im Knochenmark, Blut, Milz und allen anderen Organen der Maus kam. Diese erreichte nach ~7-9 Wochen ihr Maximum, wobei B-lymphoide Zellen myeloide Zellen überwogen. T-Zell-Vorläufer sowie potentielle PHSZ waren nachweisbar, reife T-Lymphozyten wurden dagegen nicht gebildet. Die Verdopplung der Transplantatdosis konnte den Anteil humaner Zellen nicht erhöhen; deren Expansion war dementsprechend reduziert. Vermutlich erfolgt durch die hohe Zellzahl das Homing der PHSZ in das Knochenmark der NOD/SCID Maus nicht so effizient wie bei einer geringeren Zelldosis. Routinemäßig angelegte Langzeitkulturen von Knochenmarkzellen bestätigten diese Ergebnisse. Die zusätzliche Unterstützung der humanen Hämatopoese durch hIL-3 führte in diesem

Ansatz zu einer beschleunigten Bildung humaner Zellen im Knochenmark, wobei der Anteil myeloider Zellen gegenüber lymphoider Zellen stieg. Dieser Myelopoese fördernde Effekt konnte auch in *in vitro* Experimenten beobachtet werden. Ob mit oder ohne zusätzliches hIL-3 war der Anteil humaner Zellen im Knochenmark deutlich höher als in der Milz und im Blut. In einzelnen Versuchen konnten 80%-90% humaner Zellen im Knochenmark transplantiert NOD/SCID Mäuse detektiert werden.

### III.3 Transplantation von CD34<sup>+</sup> Zellen

Ob die PHSZ wirklich CD34 positiv ist oder nicht, wird zur Zeit kontrovers diskutiert (Goodell, 1999). Es wird doch in der Mehrheit davon ausgegangen, daß sie sich in der CD34<sup>+</sup> Fraktion von Nabelschnurblut befindet. Als weitere Marker der PHSZ werden CD133 oder CXCR4 diskutiert (Yin, 1997; de Wynter, 1998). Zur Anreicherung der PHSZ wurden in dieser Arbeit CD34<sup>+</sup> Zellen aus Nabelschnurblut isoliert. Nach Transplantation von CD34<sup>+</sup> Zellen in NOD/SCID Mäuse konnte ebenfalls eine Multilinien-Hämatopoese in Knochenmark, Blut, Milz und allen anderen Organen detektiert werden. Im direkten Vergleich erschien die CB-MNC initiierte Hämatopoese gegenüber der CD34<sup>+</sup> initiierten Hämatopoese verzögert. Die Expansion humaner Zellen war nicht signifikant höher als nach Transplantation von CB-MNC. Nach Transplantation der CD34<sup>+</sup> abgereicherten Fraktion kam es zu einer stark reduzierten, aber detektierbaren Bildung humaner Zellen. Entweder waren noch SRC in der CD34<sup>-</sup> Zellfraktion enthalten, oder die Markierung der CD34 Zellen vor der Anreicherung war unvollständig, so daß noch geringe Mengen CD34 positive Zellen im Durchlauf der Säule enthalten waren. In Verdünnungsexperimenten konnte gezeigt werden, daß die Transplantation von 5000 CD34<sup>+</sup> Zellen zur Repopulation des murinen Knochenmarks mit humanen Zellen genügt, eine geringfügige Kontamination mit CD34<sup>+</sup> Zellen sollte also für ein geringes Engraftment hinreichend sein (Larochelle, 1996). Bei der Transplantation von CD34<sup>+</sup> Zellen wurde deutlich, daß mit zunehmendem Reinheitsgrad der CD34<sup>+</sup> Zellen eine zusätzliche Gabe von hIL-3 wichtiger wurde. Offensichtlich produzieren kontaminierende Lymphozyten ausreichend Cytokine, um das Homing und die Bildung humaner Zellen zu fördern. Betrug die Reinheit der CD34<sup>+</sup> Zellen >95%, war der Zusatz von hIL-3 für die Bildung hoher Anteile humaner Zellen essentiell. Das Ausmaß der Bildung humaner Zellen korrelierte nicht zum Serum-Spiegel an hIL-3.

Neben der Myelopoese-fördernden Wirkung von hIL-3 konnte in diesem Modell gezeigt werden, daß hIL-3 unreife Zellen zur Differenzierung anregt (Blalock, 1999). Wurde CD34<sup>+</sup> transplantierten Mäusen hIL-3 zugesetzt, waren die humanen PHSZ

im chimären Knochenmark offensichtlich so weit differenziert, daß sie das Knochenmark einer damit sekundär-transplantierten Maus nicht mehr repopulierten. Erhielten die Mäuse kein hIL-3, konnte mit deren Knochenmarkzellen das Knochenmark einer sekundär-transplantierten Maus repopuliert werde. Diese Ergebnisse wurden in LTBMV Versuchen bestätigt, in denen der Stimulus der Passage die Kulturen zu einer gesteigerten Bildung humaner Zellen anregte, wenn die Mäuse kein hIL-3 bekommen hatten. In LTBMV aus Mäusen mit hIL-3 war diese Steigerung nicht möglich, die Zellen waren offensichtlich bereits zu stark differenziert. In diesem Zusammenhang sind Ergebnisse interessant, die zeigen, daß nur CD34<sup>+</sup> Zellen in der G0-Phase des Zellzyklus das Knochenmark der Maus repopulieren, während das Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus nur in weitaus geringerem Ausmaß tun (Gothot, 1998). Es muß überprüft werden, ob hIL-3 die PHSZ aus der G0-Phase in die G1-Phase des Zellzyklus bringt. Im Knochenmark von Mäusen mit und ohne hIL-3 waren CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> Zellen nachweisbar. Eine genauere Subtypisierung (z. B. nach CD38, AC133, CXCR4) der CD34<sup>+</sup> Zellen soll zeigen, ob der hIL-3 Zusatz zu einem veränderten Phänotyp der CD34<sup>+</sup> Zellen führt.

#### III.4 Bildung nicht-hämatopoetischer Zellen in der NOD/SCID Maus

Zusätzlich zur Bildung einer Multilinen-Hämatopoese wurde in den NOD/SCID Mäusen nach Transplantation von CB-MNC und CD34<sup>+</sup> Zellen die Bildung nicht-hämatopoetischer Zellen beobachtet. Diese Zellen waren im Knochenmark und der Milz immunocytochemisch nachweisbar und zeigten in LTBMV teilweise deutlich die Morphologie von Endothelzellen. Die Expression endothelzell-spezifischer Marker wie EN-4 oder vWF konnte auch dort mit immunocytochemischen Methoden gezeigt werden. Es ist bemerkenswert, daß aus der CD34<sup>+</sup> Fraktion des Nabelschnurblutes nicht nur hämatopoetische Zellen, sondern auch NHZ gebildet werden. Die CD34<sup>+</sup> Fraktion enthält nicht nur Zellen mit hämatopoetischer Pluripotenz, sondern zusätzlich auch Vorläuferzellen für Endothelzellen und Stromazellen (ZEP, zirkulierende Endothelzell Progenitoren) (Rafii, 2000; Shi, 1998). Ähnliche Beobachtungen konnten in *in vitro* Experimenten gemacht werden (Nieda, 1997). Im Gegensatz zu den hämatopoetischen Zellen hatte hIL-3 keinen fördernden Einfluß auf die Bildung von NHZ in der Maus. Viel mehr schien der Anteil gebildeter nicht-hämatopoetischer Zellen vom verwendeten Nabelschnurblut abzuhängen. Während in manchen Versuchen zwischen 15% und 20% der humanen Zellen NHZ waren, betrug deren Anteil in anderen Versuchen unter sonst identischen Versuchsbedingungen lediglich 1-2%. Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob hämatopoetische Zellen und NHZ tatsächlich eine gemeinsame Vorläuferzelle besitzen oder sich nur zusammen in der CD34<sup>+</sup> Fraktion des Nabelschnurblutes

befinden. Eine genauere Einteilung der CD34<sup>+</sup> Fraktion in verschiedene CD34<sup>+</sup>-Subpopulationen vor der Transplantation wird sich dieser Fragestellung annehmen.

#### **IV. Einfluß von HHV-6 auf die Bildung humaner Zellen in der NOD/SCID Maus.....**

Untersuchungen zum Einfluß von HHV-6 auf die humane Hämatopoese sind bisher nur an stark vereinfachenden *in vitro* Systemen durchgeführt worden. Diese Systeme werden der Komplexität der humanen Hämatopoese jedoch nicht gerecht, da sie nicht die PHSZ, sondern bereits linienspezifisch geprägte Vorläuferzellen in einer nicht-physiologischen Umgebung erfassen. In dieser Arbeit wurde das erste Mal das *in vivo* Hämatopoese-Modell der NOD/SCID Maus genutzt, um den Einfluß von HHV-6 auf die Bildung hämatopoetischer Zellen zu untersuchen. Obwohl es ein *in vivo* Modell ist, kann es die Situation der klinischen Knochenmark- und Stammzell-Transplantation jedoch nicht vollständig simulieren. Während in der klinischen Situation der Stammzell-Empfänger in den meisten Fällen bereits latent HHV-6 infiziert ist und es durch Erkrankung und Therapie zu einer Reaktivierung des Virus kommt, ist eine latente Infektion der NOD/SCID Maus mit HHV-6 nicht problemlos möglich. Wie gezeigt werden konnte, sind Zellen der Maus nicht mit HHV-6 infizierbar. Trotzdem kann in diesem *in vivo* Modell der Einfluß von HHV-6 auf die Expansion und Differenzierung von PHSZ untersucht werden, zunächst unabhängig davon, ob der virale Einfluß durch latentes, reaktiviertes Virus oder mit den PHSZ injiziertes Virus hervorgerufen wird.

##### **IV.1 .....nach Transplantation von CB-MNC**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die unmittelbar vor Transplantation durchgeführte Inkubation der CB-MNC mit HHV-6A zu einem verminderten Anteil humaner Zellen in allen Organen der NOD/SCID Mäuse führt. Sofern nachweisbar, waren der Anteil einzelner Zellreihen ebenso wie die Bildung von NHZ, gemessen an der Gesamtzahl humaner Zellen, unverändert. Nach Inkubation mit HHV-6B konnten keine Veränderungen gegenüber Mock-infizierten Mäusen bemerkt werden. Es kam zur Ausbildung einer Multilinen-Hämatopoese und auch die Bildung humaner NHZ war unbeeinträchtigt. In allen Organen der Mäuse konnte sowohl HHV-6A als auch HHV-6B DNA nachgewiesen werden, die Viruslast bezogen auf 100 humane Zellen war für HHV-6B sogar höher als für HHV-6A. Offensichtlich ist die Anzahl der HHV-6A infizierten Zellen geringer. Aus *in vitro* Experimenten ist bekannt, daß HHV-6A infizierte Zellen eher lysiert als HHV-6B (Yasukawa, 1999b). Demnach ist auch möglich, daß die HHV-6A infizierten Zellen in der Maus lysieren

und der Anteil humaner Zellen sich verringert. Das würde ebenfalls erklären, warum im Knochenmark HHV-6B infizierter Mäuse HHV-6 Antigen nachgewiesen werden konnte, während das im Knochenmark HHV-6A infizierter Mäuse nicht möglich war. Möglicher Weise wird der inhibierende Einfluß auch durch die Infektion von Stromazellen vermittelt. In diesem Modell konnte jedoch keine Inhibition bei der Bildung von NHZ beobachtet werden, was natürlich noch nicht deren volle Funktionsfähigkeit beweist. Eine andere Möglichkeit wäre, daß der Hämatopoese-reduzierende Einfluß von HHV-6 nicht direkt, durch die Infektion der Zellen vermittelt ist, sondern indirekt, z.B. durch die Modifikation des Cytokin-Musters der humanen Zellen. Einige Arbeiten beschreiben die Veränderung der Cytokin-Produktion *in vitro* nach HHV-6 Infektion (Burd, 1993; Flamand, 1996; Flamand, 1991; Flamand, 1995). In einer gerade begonnenen eigenen Studie wird zur Zeit der Einfluß von HHV-6A und HHV-6B auf die Cytokin-Produktion in CB-MNC untersucht. Dabei wird nach HHV-6 Infektion die stimulierbare Produktion von 13 Cytokinen auf transkriptioneller Ebene durch quantitative RT-PCR und auf translationaler Ebene durch intracelluläre Cytokin-Färbung und ELISA gemessen. Dabei wird erwartet, daß HHV-6A und HHV-6B unterschiedliche Veränderungen bewirken, was erklären könnte warum trotz nachgewiesener Infektion der Zellen mit HHV-6B die Hämatopoese in diesen Mäusen nicht beeinträchtigt ist.

Vergleichbare Ergebnisse bezüglich des Engraftments wurden ebenfalls erhalten, wenn die Infektion der Mäuse erst drei, bzw. 12 Tage nach der Transplantation erfolgte. Nach Infektion mit HHV-6A kam es zu einer deutlich reduzierten Expansion humaner Zellen, während HHV-6B keinen Einfluß darauf hatte. Zur Zeit gibt es erst eine Studie in der ein Mausmodell zur Untersuchung der Pathogenese von HHV-6 verwendet wurde (Gobbi, 1999). Im Modell der SCID-hu-Thy/Liv Maus, bei der die Transplantation von fötalem Thymus- und Lebergewebe erfolgt, konnte gezeigt werden, daß HHV-6A und HHV-6B zu einer Zerstörung humaner intrathymischer Vorläuferzellen führen.

In Inaktivierungsexperimenten konnte gezeigt werden, daß nur intaktes Virus das Engraftment humaner Zellen reduzierte. Weder hitzedenaturierte noch UV-bestrahlte und damit replikationsunfähige Viren führten nach Transplantation zu ähnlichen Ergebnissen. Um den Einfluß im Kulturüberstand befindlicher Cytokine auszuschließen, wurden HHV-6 Partikel durch Filtration aus dem Überstand HHV-6A infizierter CB-MNC Kulturen entfernt, d.h. ein Kontrollüberstand erzeugt, der wirklich identisch mit HHV-6-haltigen Überständen ist, jedoch keine Viruspartikel enthält. Dieser Überstand führte zu einem vergleichbaren Anteil humaner Zellen in CB-MNC transplantierten NOD/SCID Mäusen wie der normaler Weise verwendete Mock-Überstand von nicht infizierten CB-MNC Kulturen. Diese Ergebnisse deuten

darauf hin, daß der Hämatopoese-inhibierende Effekt von HHV-6A von der Replikation des Virus abhängt.

#### **IV.2 .....nach Transplantation von CD34<sup>+</sup> Zellen**

Wurden in völlig analogem Ansatz CD34<sup>+</sup> Zellen vor der Transplantation mit HHV-6 inkubiert, so konnte keine Veränderung gegenüber der Mock-Infektion beobachtet werden, weder bezüglich der Bildung einer Multilinen-Hämatopoese, noch der Bildung nicht hämatopoetischer Zellen. HHV-6 DNA oder RNA waren nicht nachweisbar. Auch in zwei weiteren Experimenten konnte bestätigt werden, daß die Inkubation von CD34<sup>+</sup> Zellen vor der Transplantation keinen Einfluß auf das Engraftment hat. Es ist möglich, daß CD34<sup>+</sup> Zellen direkt nach der Anreicherung nicht mit HHV-6 infizierbar sind. Deshalb wurden in einem weiteren Versuch CD34<sup>+</sup> Zellen transplantiert und erst nach 12 Tagen HHV-6-haltige Kulturüberstände injiziert. Dabei kam es zu vergleichbaren Ergebnissen wie nach Transplantation von CB-MNC: Der Anteil humaner Zellen war nach HHV-6A Infektion stark reduziert. HHV-6A und HHV-6B DNA waren in Knochenmark und Thymus nachweisbar, HHV-6B RNA konnte im Knochenmark nicht detektiert werden. Offensichtlich sind in den 12 Tagen p.t. in der Maus Zellen gebildet worden, die suszeptibel für HHV-6 sind. Dabei ist wieder nicht klar, ob es sich um einen direkten Effekt, d.h. die Infektion dieser Zellen mit anschließender Lyse, oder um einen indirekten Effekt, durch eine in der Maus gesteigerte Produktion inhibierender Cytokine, handelt. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre, daß die CD34<sup>+</sup> Zellen unmittelbar nach der Sortierung durch den dadurch verursachten Streß ruhen und nicht infizierbar sind. Bei einer Infektion 3 Tage nach der Transplantation, wo die CD34<sup>+</sup> Zellen sich vom Streß der Sortierung erholt haben sollten, war noch kein Unterschied zu bemerken, was dafür spricht, daß tatsächlich der Reifegrad der in der Maus vorhandenen humanen Zellen entscheidend ist. In folgenden Versuchen soll der Zeitpunkt nach Transplantation ermittelt werden, zu dem eine Reduzierung des Engraftments humaner Zellen in der NOD/SCID Maus stattfindet. Eine genaue Analyse der humanen Zellen im Knochenmark der Mäuse während der ersten Tage nach Transplantation kann darüber Aufschluß geben, welche Zelltypen notwendig für eine HHV-6 Infektion sind. Problematisch wird dabei der zu dieser Zeit noch sehr geringe Anteil humaner Zellen in der Maus sein.

Der Chemokin-Rezeptor CXCR4 war im Transplantat (CB-MNC und CD34<sup>+</sup> Zellen) nachweisbar, wegen unspezifischer Wechselwirkungen mit murinen Zellen in chimärem Knochenmark jedoch nicht möglich. CXCR4 spielt eine entscheidende Rolle beim Homing der PHSZ in das Knochenmark der Maus (Peled, 1999). In einem anderen Zusammenhang konnte gezeigt werden, daß HHV-6 die Expression

von CXCR4 inhibiert (Yasukawa, 1999a). Um zu prüfen, ob HHV-6A auch in der NOD/SCID Maus die Expression von CXCR4 inhibiert, müssen andere Antikörper Klone zur Erkennung von CXCR4 getestet werden.

Aus den hier gezeigten Ergebnissen kann folgende Hypothese erstellt werden. Bei Infektion transplantiertes CB-MNC werden bestimmte Zellen im Transplantat infiziert, bevorzugt T-Lymphozyten. In diesen Zellen kann HHV-6A replizieren und bleibt so im Organismus der Maus als aktives Virus. Von dort aus kann es dann direkt oder indirekt die Proliferation humaner Vorläuferzellen inhibieren, wobei der Mechanismus noch geklärt werden muß. Die Differenzierung der humanen Zellen ist nicht verändert, was darauf schließen läßt, daß eine frühe Vorläuferzelle mit Multidifferenzierungspotential betroffen ist. Da es sich dabei um die PHSZ handelt ist eher unwahrscheinlich, da die Infektion von CD34<sup>+</sup> Zellen keinen Einfluß hat. Nach Differenzierung der CD34<sup>+</sup> Zellen im Knochenmark der Maus entstehen dabei Zellen, deren Proliferation durch HHV-6 inhibierbar ist. Werden die CD34<sup>+</sup> Zellen unmittelbar vor der Transplantation infiziert, existieren noch keine Zielzellen für HHV-6. Bis diese sich entwickelt haben, ist kein replikationsfähiges Virus mehr in der Maus vorhanden. Deshalb ist in diesen Mäusen auch kein HHV-6 DNA mehr nachweisbar.

### **IV.3 Anmerkungen zum NOD/SCID Maus Modell**

Bei der Etablierung und Anwendung dieses Hämatopoese-Modells kristallisierten sich noch einige wichtige Faktoren heraus, die zur Durchführung essentiell sind. Entscheidend für ein erfolgreiches, effizientes Engraftment humaner PHSZ in der Maus ist der Zustand des Nabelschnurblutes. Individuelle Schwankungen bei der Zusammensetzung des Nabelschnurblutes und seines CD34<sup>+</sup> Gehaltes sind unvermeidbar. Ebenso spielen individuelle Schwankungen der Mäuse eine wichtige Rolle. Bei Transplantation identischer Zellmengen aus identischer Quelle konnten auffällige Schwankungen im Anteil humaner Zellen auftreten. Obwohl genetisch identisch, sind die einzelnen Mäuse doch Individuen. Ein weiteres Problem ist die statistische Wichtung von Experimenten am NOD/SCID Maus Modell. So erwies sich bei Transplantation von CD34<sup>+</sup> Zellen die Menge des Nabelschnurblutes als limitierender Faktor. Die Transplantation von 9 Mäusen erfordert 100 – 120 mL frisches Nabelschnurblut. Damit ist die Grenze dessen erreicht, was bei einer Geburt an Nabelschnurblut gewonnen werden kann. Um zusätzliche Wechselwirkungen zwischen dem Blut verschiedener Kinder auszuschließen, wurde für einen Versuch nur Blut eines Kindes verwendet und die Blutproben nicht

vermischt. Daraus folgt, daß jeder einzelne Versuch die entsprechenden Kontrollen enthalten sollte, da Vergleiche innerhalb von verschiedenen Versuchen nur begrenzt zulässig sind.

## **V. Anzucht von Endothelzellen aus CB-CD34<sup>+</sup> Zellen**

Wie vom HCMV bekannt ist, kann die Infektion von Knochenmark-Stromazellen auf indirektem Wege die Hämatopoese inhibieren (Lagneaux, 1996; Mayer, 1997). Deshalb wurde *in vitro* die Differenzierung von zirkulierenden Endothelzell Progenitoren (ZEP) zu Zellen mit Endothelzell-Charakter etabliert. Wie im Mausmodell konnte gezeigt werden, daß in der CD34<sup>+</sup> Zellfraktion Vorläuferzellen für Endothelzellen vorhanden sind. Mittlerweile weiß man, daß sich diese ZEP in der AC133<sup>+</sup> Fraktion der CD34<sup>+</sup> Zellen befinden. Die Differenzierung zu Endothelzellen konnte morphologisch, immunocytochemisch und mit zu diesem Zweck etablierten quantitativen RT-PCR Tests zum Nachweis von CD31, KDR und vWF RNA bewiesen werden.

Wurden diese Kulturen nach 7 Tagen mit HHV-6 infiziert, so zeigte sich eine reduzierte Expression der Marker KDR und vWF, verglichen mit der Mock-Infektion. Für die Infektion mit HHV-6B konnte das mit der RT-PCR bestätigt werden, während HHV-6A keinen Einfluß hatte. Die Expression von CD31 war offensichtlich nicht betroffen. In den Kulturen waren viele der Zellen nach HHV-6A und HHV-6B Infektion pyknotisch oder tot. HHV-6 RNA beider Varianten war in den Kulturen in geringer Menge nachweisbar. Die immunocytochemische Doppelfärbung zeigte zwar HHV-6 infizierte Zellen in diesen Kulturen, jedoch konnten keine HHV-6 infizierten Endothelzellen dargestellt werden.

Ein generell schlechteres Wachstum der infizierten Kulturen könnte die verhältnismäßig geringere Differenzierung zu Endothelzellen erklären. Ein für Endothelzellen spezifischer inhibierender Effekt war mit diesen Versuchen nicht eindeutig nachweisbar. Trotzdem scheint es nach HHV-6 Infektion im Rahmen eines schlechteren Zellwachstums auch zu einer reduzierten Bildung von Endothelzellen zu kommen. Diese Ergebnisse bedürfen weiterer Untersuchungen, auch des Cytokin-Musters dieser Zellen.