Aus der Klinik für Hämatologie/Onkologie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einflussfaktoren für eine Graft-versus-host-Disease bei der Stammzelltransplantation

Analyse von Zytokinexpressionsmustern in peripheren und Nabelschnurblutleukozyten sowie Einfluss einer Infektion mit humanem Herpesvirus 6

Zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Theresa Clauss

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Wolfgang Siegert 2. Prof. Dr. Markus Ruhnke

3. PD Dr. Nimrod Schwella

Datum der Promotion: 18.09.2009

Inhaltsverzeichnis

1.	Einle	eitung	. 1
1.1	DIE	HUMANE HÄMATOPOESE	2
1	.1.1	Die hämatopoetische Stammzelle	
1	.1.2	Das Zelloberflächen-Antigen CD34.	
1	1.1.3	Die Steuerung der humanen Hämatopoese	
1.2		OKINE/WACHSTUMSFAKTOREN	
	1.2.1	Allgemeines	
	.2.2	Th1-Zellen	
	1.2.3	Th2-Zellen	
	1.2.4	Hämatopoetische Zytokine (Hämatopoetine)	
	.2.5	Transkriptionsfaktoren der T-Helfer-Zellen.	
1.3		OCHENMARK- UND STAMMZELLTRANSPLANTATION	
	1.3.1	Allgemeines	
	1.3.1	Gewinnung von Stammzellen	
	1.3.2	Transplantationsprocedere	
	1.3.3	* *	
		Vor- und Nachteile von Nabelschnurblut für die Transplantation	
	1.3.5	Vergleich Nabelschnurblut versus peripheres Blut	
1.4		AFT-VERSUS-HOST-DISEASE (GVHD)	
	1.4.1	Definition und Äthiologie	
	1.4.2	Akute GVHD	
	1.4.3	Die Rolle von Zytokinen in der akuten GVHD	
	.4.4	Chronische GVHD	
	.4.5	Prophylaxe und Therapie	
		HUMANE HERPESVIRUS 6 (HHV-6)	
	1.5.1	Epidemiologie	
	1.5.2	Morphologie	
	.5.3	Morphogenese	
	.5.4	Pathogenese und klinische Manifestation	
	.5.5	HHV-6 und Myelosuppression.	
	.5.6	Virusbiologie	
1	.5.7	Antivirale Therapie bei HHV-6	.21
1.6	AUF	GABENSTELLUNG:	. 22
2.	Mate	erial und Methoden	24
2.1	Мет	THODEN	. 24
2	2.1.1	Gewinnung von Nabelschnurblut	
2	2.1.2	Isolierung von Nabelschnurblutleukozyten	
2	2.1.3	Gewinnung von peripherem Blut	
2	2.1.4	Zellzählung	
	2.1.5	Zell- und Viruskultur	.25
_	2.1.5.1	Stimulation mononukleärer Zellen aus Nabelschnurblut	
	2.1.5.2		
		Nabelschnurblut und peripherem Blut	. 26
	2.1.5.3	Kultivierung von HHV-6	
	2.1.5.4	Infektion von Zelle zu Zelle	. 26
	2.1.5.5	Infektion mit zellfreien Kulturüberständen	
2	2.1.6	Immunfluoreszenz-Assay (IFA) und Bestimmung des Anteils infizierter Zellen	
2	2.1.7	Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS)	.27

Inhaltsverzeichnis

	2.1.7.1	Immunfluoreszenzmarkierung von Leukozyten	 27
	2.1.7.1		
	2.1.7.3	Prinzip der Durchflusszytometrie	
	2.1.8	Isolierung von RNA	
	2.1.9	Reverse Transkription und rt-PCR	
	2.1.10	Kern- und Zytosolextraktion	
	2.1.11	Bestimmung der DNA Bindungsaktivität von Transkriptionsfaktoren	
	2.1.12	ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	
_	2.1.13	Statistische Analyse	
2		TERIAL UND CHEMIKALIEN	
	2.2.1 2.2.2	Puffer	
	2.2.2	Zellzucht und IFA Durchflusszytometrie	
	2.2.3	rt- PCR und ELISA	
3.	Erge	bnisse	. 38
3	.1 VER	GLEICH NABELSCHNURBLUT VS. PERIPHERES BLUT	38
	3.1.1	Analyse der Lymphozytenpopulationen in peripherem Blut und Nabelschnurblut	20
	3.1.2	Einfluss verschiedener Stimuli auf peripheres Blut und Nabelschnurblut	
	3.1.2	Kinetik der Zytokininduktion	
	3.1.4	Aktivierung von Transkriptionsfaktoren in Nabelschnurblut	
	3.1.5	Unterschiede in der Expression der Transkriptionsfaktoren	
	3.1.6	Kinetik der Induktion von Transkriptionsfaktoren	
3	.2 Eini	FLUSS VON HHV-6 AUF DIE ZYTOKINPRODUKTION	
	3.2.1	Nachweismethoden von HHV-6	
	3.2.2	HHV-6 als möglicher Stimulus der Zytokininduktion	
	3.2.3	HHV-6 Langzeitkinetik und Stimulation	71
4.	Disk	ussion	. 78
4	.1 Ver	GLEICH NABELSCHNURBLUT VS. PERIPHERES BLUT	78
	4.1.1	Vergleich der Lymphozytenpopulationen in peripherem Blut und Nabelschnu	
		mittels FACS	
	4.1.2	Einfluss der Lymphozytenpopulation auf die Zytokinproduktion	
	4.1.3	Kinetik der Zytokininduktion	
	4.1.4	Regulation der Zytokinproduktion durch Transkriptionsfaktoren	
1	4.1.5	Einfluss der Zytokinproduktion auf die GVHD	
4	.2 Eini 4.2.1	FLUSS VON HHV-6 AUF DIE ZYTOKINPRODUKTION	
	4.2.1	HHV-6 als möglicher Stimulus der Zytokinproduktion	
	4.2.3	Zytokinexpression in Langzeitkinetik mit HHV-6 Infektion und Stimulation	
	4.2.4	Einfluss von HHV-6 auf die GVHD	91
5.	Zusa	mmenfassung	. 93
6.	Litel	atur	. 73
7.	Danl	ksagung	108
8.	Lehe	enslauf	109

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der humanen Hämatopoese	2
Abbildung 2: Die Immunpathophysiologie der GVHD	
Abbildung 3: Schematische und elektronenmikroskopische Darstellung eines HHV-6A Virion	18
Abbildung 4: Pathogenese von HHV-6	.20
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes	.23
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Strahlenganges eines FACScan-Gerätes	.29
Abbildung 7: Prinzip der TaqMan Reaktion	
Abbildung 8: FACS-Analyse der Lymphozyten und zusätzliche Färbung mit CD45	40
Abbildung 9: FACS-Analyse von CD45Ra und CD4 und zusätzliche Färbung mit CD45	
Abbildung 10: Exemplarische Darstellung von Dot-Plots	.42
Abbildung 11: Lymphozyten in FACS Analysen von PBL und CBL	.43
Abbildung 12: CD4 ⁺ Expression von Lymphozyten in FACS Analysen mit PBL und CBL	.44
Abbildung 13: CD3 ⁺ /CD28 ⁺ Lymphozyten in FACS Analysen mit PBL und CBL	.45
Abbildung 14: CD45Ra ⁺ Lymphozyten in FACS Analysen mit PBL und CBL	.46
Abbildung 15: CD45Ro ⁺ Lymphozyten in FACS Analysen mit PBL und CBL	.47
Abbildung 16: Induktion von IL-2	.49
Abbildung 17: Induktion von IFNγ	. 50
Abbildung 18: Induktion von IL-4	
Abbildung 19: Induktion von IL-5	
Abbildung 20: Induktion von IL-13	
Abbildung 21: Induktion von IL-3.	
Abbildung 22: Induktion von GM-CSF	
Abbildung 23: Kinetik der Zytokininduktion für Th1-Zytokine	
Abbildung 24: Kinetik der Zytokininduktion für Th2-Zytokine	
Abbildung 25: Kinetik der Zytokininduktion für hämatopoetische Zytokine	
Abbildung 26: Aktivität der Transkriptionsfaktoren	
Abbildung 27: Induktion des Transkriptionsfaktors T-bet.	
Abbildung 28: Induktion des Transkriptionsfaktors c-maf	
Abbildung 29: Induktion des Transkriptionsfaktors GATA-3	
Abbildung 30: Kinetik der Induktion von Transkriptionsfaktoren.	
Abbildung 31: cLSM Aufnahme HHV-6B infizierter CB-MNC	
Abbildung 32: Anteil toter Zellen in der Zellkultur	
Abbildung 33: Anteil infizierter Zellen im IFA-Präparat	
Abbildung 34: Kurzzeitkinetik Th1-spezifischer Zytokine	
Abbildung 35: Kurzzeitkinetik Th2-spezifischer Zytokine.	
Abbildung 36: Kurzzeitkinetik des hämatopoetisch spezifischen Zytokins GM-CSF	.70
Abbildung 37: Th1-Zytokine infizierter CBL	
Abbildung 38: Th2-Zytokine infizierter CBL	
Abbildung 39: Hämatopoetische Zytokine infizierter CBL.	
Abbildung 40: Verteilung von CD 45Ra und CD45Ro in CBL und PBL	.81

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Lymphozyten-Oberflächenmarker	4
Tabelle 2: Th-spezifische Zytokine	5
Tabelle 3: Th2-spezifische Zytokine	6
Tabelle 4: Subgruppen der Hämatopoetine	7
Tabelle 5: Spezifische hämatopoetische Zytokine (Subtyp 1)	
Tabelle 6: Vor- und Nachteile von Nabelschnurblut für Transplantationen	
Tabelle 7: Klassifizierung der chronischen GVHD	16
Tabelle 8: Biologie des humanen Herpesvirus 6 (HHV-6)	21
Tabelle 9: Absorptions- und Emissionsmaxima von den in der Durchflusszytometrie ein	ngesetzten
Fluoreszenzfarbstoffen	28
Tabelle 10: Substanzen für die Stimulation der CB-MNC	35
Tabelle 11: FACS-Antikörper	35

Abkürzungsverzeichnis

°C. Grad Celsius μl Mikroliter CB Cord Blood (engl., Nabelschnurblut) CBI. Cord Blood Mononuclear Cells (engl., Nabelschnurblut mononukleäre Zellen) CB-MNC Cord Blood Mononuclear Cells (engl., Nabelschnurblut mononukleäre Zellen) CD Cluster of Differentiation (engl.) CFC Colony forming cells (engl., koloniebildende Zellen) CFU Colony forming units (engl., koloniebildende Einheit) cLSM confokales Laser Scanning Mikroskop CMV Cytomegalievirus CPE Cytopathic effect (engl., zythopathischer Effekt) CSF Colony stimulating factors (engl., hämatopoctische Wachstumsfaktoren, die koloniestimulierenden Faktoren) CT Treshhold Cycle (engl. Schwellenzyklus) CTL zytotoxische T-Lymphozyten ELISA Enzyme-linked Immunosorbent Assay (engl.) EPO Erythropoetin FACS Fluorescence Activated Cell Sorting (engl., Durchflusszytometrie) Ficoll - Dichtegradienten-Zentrifugation FTTC Fluoresceinisothiocyanat FKS Fötales Kälberserun FOG Friends	°C	Grad Calaina		
CB Cord Blood (engl., Nabelschnurblut Leukozyten) CBL Cord Blood Leucocytes (engl., Nabelschnurblut Leukozyten) CB-MNC Cord Blood Mononuclear Cells (engl., Nabelschnurblut mononukleäre Zellen) CD Cluster of Differentiation (engl.) CFC Colony forming cells (engl., koloniebildende Zellen) CFU Colony forming units (engl., koloniebildende Einheit) cLSM confokales Laser Scanning Mikroskop CMV Cytopathic effect (engl., zythopathischer Effekt) CSF Colony stimulating factors (engl., hämatopoetische Wachstumsfaktoren, die koloniestimulierenden Faktoren) CT Treshhold Cycle (engl. Schwellenzyklus) CTL zytotoxische T-Lymphozyten ELISA Enzyme-linked Immunosorbent Assay (engl.) EPO Erythropoetin FACS Fluorescence Activated Cell Sorting (engl., Durchflusszytometrie) Ficoll Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation FITC Fluorescence Activated Cell Sorting (engl., Durchflusszytometrie) Ficoll Ficinets of GATA (engl., Freund von GATA) FSC Fortales Kälberserum FOG Friends of GATA (engl., Freund von GATA) FSC <				
CBL Cord Blood Lucocytes (engl., Nabelschnurblut Leukozyten) CB-MNC Cord Blood Mononuclear Cells (engl., Nabelschnurblut mononukleäre Zellen) CD Cluster of Differentiation (engl.) CFC Colony forming cells (engl., koloniebildende Zellen) CFU Colony forming units (engl., koloniebildende Einheit) cLSM confokales Laser Scanning Mikroskop CMV Cytomegalievirus CFE Cytopathic effect (engl., zythopathischer Effekt) CSF Colony stimulating factors (engl., hämatopoetische Wachstumsfaktoren, die koloniestimulierenden Faktoren) CT Treshhold Cycle (engl. Schwellenzyklus) CTL zytotoxische T-Lymphozyten ELISA Enzyme-linked Immunosorbent Assay (engl.) EPO Erythropoetin FACS. Fluorescence Activated Cell Sorting (engl., Durchflusszytometrie) Ficoll Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation FITC Fluorescence Activated Cell Sorting (engl., Durchflusszytometrie) FixS. Fötales Kälberserum FOG Friends of GATA (engl., Freund von GATA) FSC Forward Scatter (engl., Vorwärtsstreuung) G-CSF Granulocyte-colony stimulating factor (engl., Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor) GM-CSF Granulocyten-Monozyten Kolonie stimulierender Faktor) GWH Graft-versus-host (engl. Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung) GVL Graft-versus-host (engl., Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung) GVL Graft-versus-host (engl., Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung) HIV Humanes Herpesvirus HIA Histokompatibilitätsantigen (engl. histocompatibility antigen) HSC Hämatopoetische Stammzelle IFA Immun-Fluoreszenz-Assay (engl.) IFN Interferon In				
CB-MNC Cord Blood Mononuclear Cells (engl., Nabelschnurblut mononukleäre Zellen) CD Cluster of Differentiation (engl.) CFC Colony forming cells (engl., koloniebildende Zellen) CFU Colony forming units (engl., koloniebildende Einheit) c1SM. confokales I.aser Scanning Mikroskop CMV Cytomegalievirus CPE Cytopathie effect (engl., zythopathischer Effekt) CSF Colony stimulating factors (engl., hämatopoetische Wachstumsfaktoren, die koloniestimulierenden Faktoren) CT Treshhold Cycle (engl. Schwellenzyklus) CTL zytotoxische T-Lymphozyten ELISA Enzyme-linked Immunosorbent Assay (engl.) EPO Erythropoetin FACS Fluorescence Activated Cell Sorting (engl., Durchflusszytometrie) Ficoll Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation FTTC Fluoresceinisothiocyanat FKS. Fötales Kälberserum FOG Friends of GATA (engl., Freund von GATA) FSC Forward Scatter (engl., Vorwärtsstreuung) G-CSF Granulocyte-colony stimulating factor (engl., Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor) GM-CSF Granulocyte-Monocyte-colony stimulating factor (engl., Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor) GWH Graft-versus-host-Disease (engl., Transplantat-gegen-Wirt) GVHD Graft-versus-host-Disease (engl., Transplantat-gegen-Wirt) GVL Graft-versus-host-Disease (engl., Transplantat-gegen-Wirt) GVL Graft-versus-host-Disease (engl., Transplantat-gegen-Leukämie) h. hours (engl. Stunden) HHV Humanes Herpesvirus HLA Histokompatibilitätsantigen (engl. histocompatibility antigen) HSC Hämatopoetische Stammzelle IFA Immun-Fluoreszenz-Assay (engl.) IFN Interferon Ig Immunglobulin E Immunglobulin G III. Interleukin Iono. Ionomycin kg. Kilogramm KMT Knochemmarktransplantation LPS Lippoplysaccharid				
mononukleäre Zellen) CD				
CD. Cluster of Differentiation (engl.) CFC Colony forming cells (engl., koloniebildende Zellen) CFU Colony forming units (engl., koloniebildende Einheit) cl.SM. confokales Laser Scanning Mikroskop CMV Cytomegalievirus CPE. Cytopathic effect (engl., zythopathischer Effekt) CSF Colony stimulating factors (engl., hämatopoetische Wachstumsfaktoren, die koloniestimulierenden Faktoren) CT Treshhold Cycle (engl. Schwellenzyklus) CTL zytotoxische T-Lymphozyten ELISA Enzyme-linked Immunosorbent Assay (engl.) EPO Erythropoetin FACS Fluorescence Activated Cell Sorting (engl., Durchflusszytometrie) Ficoll. Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation FITC Fluoresceinisothiocyanat FKS. Fötales Kälberserum FOG Friends of GATA (engl., Freund von GATA) FSC. Forward Scatter (engl., Vorwärtsstreuung) G-CSF Granulocyte-colony stimulating factor (engl., Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor) GM-CSF Granulocyte-Monocyte-colony stimulating factor (engl., Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor) GVH Graft-versus-host (engl. Transplantat-gegen-Wirt) GVHD Graft-versus-host (engl., Transplantat-gegen-Wirt) Erkrankung) GVL Graft-versus-host Engl., Transplantat-gegen-Leukämie) h hours (engl., Stunden) HHV Humanes Herpesvirus HLA Histokompatibilitätsantigen (engl. histocompatibility antigen) HSC Hämatopoetische Stammzelle IFA Immun-Fluorescenz-Assay (engl.) IFFN Interferon Ig. Immunglobulin E Immunglobulin G II. Interleukin Iono Ionomycin kg. Kilogramm KMT Knochemmarktransplantation LPS Lipopolysaccharid	CB-MNC			
CFC Colony forming cells (engl., kolonic bildende Zellen) CFU Colony forming units (engl., kolonic bildende Einheit) CLSM confokales Laser Scanning Mikroskop CMV Cytomegalievirus CPE Cytopathic effect (engl., zythopathischer Effekt) CSF Colony stimulating factors (engl., hämatopoetische Wachstumsfaktoren, die koloniestimulierenden Faktoren) CT Treshhold Cycle (engl. Schwellenzyklus) CTL zytotoxische T-Lymphozyten ELISA Enzyme-linked Immunosorbent Assay (engl.) EPO Erythropoetin FACS Fluorescence Activated Cell Sorting (engl., Durchflusszytometrie) Ficoll Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation FITC Fluorescence Activated Cell Sorting (engl., Durchflusszytometrie) Ficoll Ficales Kälberscrum FOG Friends of GATA (engl., Freund von GATA) FSC Fötales Kälberscrum FOG Friends of GATA (engl., Freund von GATA) FSC Forward Scatter (engl., Vorwärtsstreung) G-CSF Granulozyte-Nonocyte-colony stimulating factor (engl., Granulozyten Kolonie stimulicrender Faktor) GWH Graft-versus-host-Disease (engl.,		,		
CFU Colony forming units (engl., koloniebildende Einheit) cLSM confokales Laser Scanning Mikroskop CMV Cytopathic effect (engl., zythopathischer Effekt) CPE Cytopathic effect (engl., zythopathischer Effekt) CSF Colony stimulating factors (engl., hämatopoetische Wachstumsfaktoren, die koloniestimulierenden Faktoren) CT Treshhold Cycle (engl. Schwellenzyklus) CTI zytotoxische T-Lymphozyten ELISA Enzyme-linked Immunosorbent Assay (engl.) EPO Erythropoetin FACS Fluorescence Activated Cell Sorting (engl., Durchflusszytometrie) Ficoll Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation FITC Fluorescenisothiocyanat FKS Fötales Kälberserum FOG Friends of GATA (engl., Freund von GATA) FSC Fötales Kälberserum GG Friends of GATA (engl., Freund von GATA) FSC Forward Scatter (engl., Vorwärtsstreuung) G-CSF Granulocyte-Monocytenstimulating factor (engl., Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor) GM-CSF Granulocyte-Monocyten Kolonie stimulierender Faktor) GVH Graft-versus-host (engl., Transplantat-gegen-Wirt </td <td></td> <td></td>				
CLSM	CFC			
CMV Cytomegalievirus CPE Cytopathic effect (engl., zythopathischer Effekt) CSF Colony stimulating factors (engl., hämatopoetische Wachstumsfaktoren, die koloniestimulierenden Faktoren) CT. Treshhold Cycle (engl. Schwellenzyklus) CTI. zytotoxische T-I.ymphozyten ELISA Enzyme-linked Immunosorbent Assay (engl.) EPO Erythropoetin FACS Fluorescence Activated Cell Sorting (engl., Durchflusszytometrie) Ficoll. Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation FITC Fluoresceinisothiocyanat FKS Fótales Kälberserum FOG Friends of GATA (engl., Freund von GATA) FSC Forward Scatter (engl., Vorwärtsstreuung) G-CSF Granulocyte-colony stimulating factor (engl., Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor) GM-CSF Granulocyte-Monocyte-colony stimulating factor (engl., Granulozyten-Monocyten Kolonie stimulierender Faktor) GVH Graft-versus-host (engl., Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung) GVL Graft-versus-host-Disease (engl., Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung) HHV Humanes Herpesvirus HLA Histokompatibilitätsantigen (engl. histocompatibility antigen) HSC Hämatopoetische Stammzelle FA Immun-Fluoreszenz-Assay (engl.) IFN Interferon Ig Immunglobulin IgE Immunglobulin IgE Immunglobulin G IL Interleukin Iono Ionomycin kg Kilogramm KMT Knochenmarktransplantation LPS Lipopolysaccharid	CFU			
CMV Cytomegalievirus CPE Cytopathic effect (engl., zythopathischer Effekt) CSF Colony stimulating factors (engl., hämatopoetische Wachstumsfaktoren, die koloniestimulierenden Faktoren) CT. Treshhold Cycle (engl. Schwellenzyklus) CTI. zytotoxische T-I.ymphozyten ELISA Enzyme-linked Immunosorbent Assay (engl.) EPO Erythropoetin FACS Fluorescence Activated Cell Sorting (engl., Durchflusszytometrie) Ficoll. Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation FITC Fluoresceinisothiocyanat FKS Fotales Kälberserum FOG Friends of GATA (engl., Freund von GATA) FSC Forward Scatter (engl., Vorwärtsstreuung) G-CSF Granulocyte-colony stimulating factor (engl., Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor) GM-CSF Granulocyte-Monocyte-colony stimulating factor (engl., Granulozyten-Monocyten Kolonie stimulierender Faktor) GVH Graft-versus-host (engl., Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung) GVL Graft-versus-host-Disease (engl., Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung) HHV Humanes Herpesvirus HLA Histokompatibilitätsantigen (engl. histocompatibility antigen) HSC Hämatopoetische Stammzelle IFA Immun-Fluoreszenz-Assay (engl.) IFN Interferon Ig Immunglobulin IgE Immunglobulin G IL Interleukin Iono Ionomycin kg Kilogramm KMT Knochenmarktransplantation LPS Lipopolysaccharid				
CPE Cytopathic effect (engl., zythopathischer Effekt) CSF Colony stimulating factors (engl., hämatopoetische Wachstumsfaktoren, die koloniestimulierenden Faktoren) CT Treshhold Cycle (engl. Schwellenzyklus) CTL zytotoxische T-Lymphozyten ELISA Enzyme-linked Immunosorbent Assay (engl.) EPO Erythropoetin FACS Fluorescence Activated Cell Sorting (engl., Durchflusszytometrie) Ficoll Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation FITC Fluoresceinisothiocyanat FKS Fötales Kälberserum FOG Friends of GATA (engl., Freund von GATA) FSC Forward Scatter (engl., Vorwärtsstreuung) G-CSF Granulocyte-Colony stimulating factor (engl., Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor) GM-CSF Granulocyte-Monocyte-colony stimulating factor (engl., Granulozyten-Monocyten Kolonie stimulierender Faktor) GVH Graft-versus-host-Disease (engl., Transplantat-gegen-Wirt) GVH Graft-versus-host-Disease (engl., Transplantat-gegen-Wirt) GVL Graft-versus-Leukemia (engl., Transplantat-gegen-Leukämie) h hours (engl., Stunden) HHV Humanes Herpesvirus				
CSF Colony stimulating factors (engl., hämatopoetische Wachstumsfaktoren, die koloniestimulierenden Faktoren) CT. Treshhold Cycle (engl. Schwellenzyklus) CTL zytotoxische T-Lymphozyten ELISA Enzyme-linked Immunosorbent Assay (engl.) EPO Erythropoetin FACS Fluorescence Activated Cell Sorting (engl., Durchflusszytometrie) Ficoll. Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation FITC Fluoresceinisothiocyanat FKS Fötales Kälberserum FOG Friends of GATA (engl., Freund von GATA) FSC Forward Scatter (engl., Vorwärtsstreuung) G-CSF Granulocyte-Colony stimulating factor (engl., Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor) GM-CSF Granulozyten-Monozyten Kolonie stimulierender Faktor) GWH Graft-versus-host (engl. Transplantat-gegen-Wirt) GVHD Graft-versus-host-Disease (engl., Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung) GVL Graft-versus-Leukemia (engl., Transplantat-gegen-Leukämie) h. hours (engl., Stunden) HHV Humanes Herpesvirus HLA Histokompatibilitätsantigen (engl. histocompatibility antigen) HSC Hämatopoetische Stammzelle IFA Immun-Fluoreszenz-Assay (engl.) IFN Interferon Ig. Immunglobulin E IgG Immunglobulin G IL Interleukin Iono Ionomycin kg Kilogramm KMT Knochenmarktransplantation LPS Lipopolysaccharid				
Wachstumsfaktoren, die koloniestimulierenden Faktoren) CT. Treshhold Cycle (engl. Schwellenzyklus) CTL zytotxische T-Lymphozyten ELISA. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (engl.) EPO Erythropoetin FACS Fluorescence Activated Cell Sorting (engl., Durchflusszytometrie) Ficoll. Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation FITC Fluoresceinisothiocyanat FKS Fötales Kälberserum FOG Friends of GATA (engl., Freund von GATA) FSC Forward Seatter (engl., Vorwärtsstreuung) G-CSF Granulocyte-colony stimulating factor (engl., Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor) GM-CSF Granulocyte-Monocyte-colony stimulating factor (engl., Granulozyten-Monozyten Kolonie stimulierender Faktor) GVH Graft-versus-host (engl. Transplantat-gegen-Wirt) GVHD Graft-versus-host Disease (engl., Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung) GVL Graft-versus-Leukemia (engl., Transplantat-gegen-Leukämie) h. hours (engl., Stunden) HHV Humanes Herpesvirus HLA Histokompatibilitätsantigen (engl. histocompatibility antigen) HSC Hämatopoetische Stammzelle IFA Immun-Fluoreszenz-Assay (engl.) IFN Interferon Ig. Immunglobulin Ig. Immunglobulin E IgG Immunglobulin G IL Interleukin Iono Ionomycin kg Kilogramm KMT Knochenmarktransplantation LPS Lipopolysaccharid				
CT				
CTL zytotoxische T-Lymphozyten ELISA. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (engl.) EPO Erythropoetin FACS Fluorescence Activated Cell Sorting (engl., Durchflusszytometrie) Ficoll. Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation FITC Fluoresceinisothiocyanat FKS Fötales Kälberserum FOG Friends of GATA (engl., Freund von GATA) FSC Forward Scatter (engl., Vorwärtsstreuung) G-CSF Granulocyte-colony stimulating factor (engl., Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor) GM-CSF Granulocyte-Monocyte-colony stimulating factor (engl., Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor) GVH Graft-versus-host (engl. Transplantat-gegen-Wirt) GVHD Graft-versus-host-Disease (engl., Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung) GVL Graft-versus-Leukemia (engl., Transplantat-gegen-Leukämie) h hours (engl., Stunden) HHV Humanes Herpesvirus HLA Histokompatibilitätsantigen (engl. histocompatibility antigen) HSC Hämatopoetische Stammzelle IFA Immun-Fluoreszenz-Assay (engl.) IFN Interferon Ig Immunglobulin E IgG Immunglobulin G IL Interleukin Iono Ionomycin kg Kilogramm KMT Knochenmarktransplantation LPS Lipopolysaccharid	CT			
ELISA Enzyme-linked Immunosorbent Assay (engl.) EPO Erythropoetin FACS Fluorescence Activated Cell Sorting (engl., Durchflusszytometrie) Ficoll Ficoll Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation FITC Fluoresceinisothiocyanat FKS Fötales Kälberserum FOG Friends of GATA (engl., Freund von GATA) FSC Forward Scatter (engl., Vorwärtsstreuung) G-CSF Granulocyte-colony stimulating factor (engl., Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor) GM-CSF Granulocyte-Monocyte-colony stimulating factor (engl., Granulozyten-Monozyten-Monozyten Kolonie stimulierender Faktor) GVH Graft-versus-host (engl. Transplantat-gegen-Wirt) GVHD Graft-versus-host-Disease (engl., Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung) GVL Graft-versus-Leukemia (engl., Transplantat-gegen-Leukämie) h hours (engl., Stunden) HHV Humanes Herpesvirus HLA Histokompatibilitätsantigen (engl. histocompatibility antigen) HSC Hämatopoetische Stammzelle IFA Immun-Fluoreszenz-Assay (engl.) IFN Interferon Ig Immunglobulin IgE Immunglobulin IgE Immunglobulin G IL Interleukin Iono Ionomycin kg Kilogramm KMT Knochenmarktransplantation LPS Lipopolysaccharid				
EPO Erythropoetin FACS Fluorescence Activated Cell Sorting (engl., Durchflusszytometrie) Ficoll Ficoll Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation FITC Fluoresceinisothiocyanat FKS Fötales Kälberserum FOG Friends of GATA (engl., Freund von GATA) FSC Forward Scatter (engl., Vorwärtsstreuung) G-CSF Granulocyte-colony stimulating factor (engl., Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor) GM-CSF Granulocyte-Monocyte-colony stimulating factor (engl., Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor) GVH Graft-versus-host (engl. Transplantat-gegen-Wirt) GVHD Graft-versus-host-Disease (engl., Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung) GVL Graft-versus-Leukemia (engl., Transplantat-gegen-Leukämie) h. hours (engl., Stunden) HHV Humanes Herpesvirus HLA Histokompatibilitätsantigen (engl. histocompatibility antigen) HSC Hämatopoetische Stammzelle IFA Immun-Fluoreszenz-Assay (engl.) IFN Interferon Ig Immunglobulin E IgG Immunglobulin G IL Interleukin Iono Ionomycin kg Kilogramm KMT Knochenmarktransplantation LPS Lipopolysaccharid				
FACS Fluorescence Activated Cell Sorting (engl., Durchflusszytometrie) Ficoll Ficoll Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation FITC Fluoresceinisothiocyanat FKS Fötales Kälberserum FOG Friends of GATA (engl., Freund von GATA) FSC Forward Scatter (engl., Vorwärtsstreuung) G-CSF Granulocyte-colony stimulating factor (engl., Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor) GM-CSF Granulocyte-Monocyte-colony stimulating factor (engl., Granulozyten-Monozyten Kolonie stimulierender Faktor) GVH Graft-versus-host (engl. Transplantat-gegen-Wirt) GVHD Graft-versus-host-Disease (engl., Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung) GVL Graft-versus-Leukemia (engl., Transplantat-gegen-Leukämie) h hours (engl., Stunden) HHV Humanes Herpesvirus HLA Histokompatibilitätsantigen (engl. histocompatibility antigen) HSC Hämatopoetische Stammzelle IFA Immun-Fluoreszenz-Assay (engl.) IFN Interferon Ig Immunglobulin IgE Immunglobulin G IL Interleukin Iono Ionomycin kg Kilogramm KMT Knochenmarktransplantation LPS Lipopolysaccharid				
Ficoll. Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation FITC Fluoresceinisothiocyanat FKS. Fötales Kälberserum FOG Friends of GATA (engl., Freund von GATA) FSC Forward Scatter (engl., Vorwärtsstreuung) G-CSF Granulocyte-colony stimulating factor (engl., Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor) GM-CSF Granulocyte-Monocyte-colony stimulating factor (engl., Granulozyten-Monozyten Kolonie stimulierender Faktor) GVH Graft-versus-host (engl. Transplantat-gegen-Wirt) GVHD Graft-versus-host-Disease (engl., Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung) GVL Graft-versus-Leukemia (engl., Transplantat-gegen-Leukämie) h hours (engl., Stunden) HHV Humanes Herpesvirus HLA Histokompatibilitätsantigen (engl. histocompatibility antigen) HSC Hämatopoetische Stammzelle IFA Immun-Fluoreszenz-Assay (engl.) IFN Interferon Ig Immunglobulin IgE Immunglobulin E IgG Immunglobulin G IL Interleukin Iono. Ionomycin kg Kilogramm KMT Knochenmarktransplantation LPS Lipopolysaccharid		•		
FITC Fluoresceinisothiocyanat FKS Fötales Kälberserum FOG Friends of GATA (engl., Freund von GATA) FSC Forward Scatter (engl., Vorwärtsstreuung) G-CSF Granulocyte-colony stimulating factor (engl., Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor) GM-CSF Granulocyte-Monocyte-colony stimulating factor (engl., Granulozyten-Monozyten Kolonie stimulierender Faktor) GVH Graft-versus-host (engl. Transplantat-gegen-Wirt) GVHD Graft-versus-host-Disease (engl., Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung) GVL Graft-versus-Leukemia (engl., Transplantat-gegen-Leukämie) h. hours (engl., Stunden) HHV Humanes Herpesvirus HLA Histokompatibilitätsantigen (engl. histocompatibility antigen) HSC Hämatopoetische Stammzelle IFA Immun-Fluoreszenz-Assay (engl.) IFN Interferon Ig Immunglobulin IgE Immunglobulin G IL Interleukin Iono Ionomycin kg Kilogramm KMT Knochenmarktransplantation LPS Lipopolysaccharid				
FKS. Fötales Kälberserum FOG. Friends of GATA (engl., Freund von GATA) FSC. Forward Scatter (engl., Vorwärtsstreuung) G-CSF Granulocyte-colony stimulating factor (engl., Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor) GM-CSF Granulocyte-Monocyte-colony stimulating factor (engl., Granulozyten Monocyte-Monocyten Kolonie stimulierender Faktor) GWH Graft-versus-host (engl. Transplantat-gegen-Wirt) GVH Graft-versus-host-Disease (engl., Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung) GVL Graft-versus-Leukemia (engl., Transplantat-gegen-Leukämie) h. hours (engl., Stunden) HHV Humanes Herpesvirus HLA Histokompatibilitätsantigen (engl. histocompatibility antigen) HSC Hämatopoetische Stammzelle IFA Immun-Fluoreszenz-Assay (engl.) IFN Interferon Ig Immunglobulin IgE Immunglobulin E IgG Immunglobulin G IL Interleukin Iono Ionomycin kg Kilogramm KMT Knochenmarktransplantation LPS Lipopolysaccharid	FITC	Elyanasasinisethia ayanet		
FOG				
FSC				
G-CSF Granulocyte-colony stimulating factor (engl., Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor) GM-CSF Granulocyte-Monocyte-colony stimulating factor (engl., Granulozyten-Monocyten Kolonie stimulierender Faktor) GVH Graft-versus-host (engl. Transplantat-gegen-Wirt) GVHD Graft-versus-host-Disease (engl., Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung) GVL Graft-versus-Leukemia (engl., Transplantat-gegen-Leukämie) h. hours (engl., Stunden) HHV Humanes Herpesvirus HLA Histokompatibilitätsantigen (engl. histocompatibility antigen) HSC Hämatopoetische Stammzelle IFA Immun-Fluoreszenz-Assay (engl.) IFN Interferon Ig Immunglobulin IgE Immunglobulin E IgG Immunglobulin G IL Interleukin Iono. Ionomycin kg Kilogramm KMT Knochenmarktransplantation LPS Lipopolysaccharid		, g		
Kolonie stimulierender Faktor) GM-CSF Granulocyte-Monocyte-colony stimulating factor (engl., Granulozyten-Monozyten Kolonie stimulierender Faktor) GVH Graft-versus-host (engl. Transplantat-gegen-Wirt) GVHD Graft-versus-host-Disease (engl., Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung) GVL Graft-versus-Leukemia (engl., Transplantat-gegen-Leukämie) h. hours (engl., Stunden) HHV Humanes Herpesvirus HLA Histokompatibilitätsantigen (engl. histocompatibility antigen) HSC Hämatopoetische Stammzelle IFA Immun-Fluoreszenz-Assay (engl.) IFN Interferon Ig Immunglobulin IgE Immunglobulin E IgG Immunglobulin G IL Interleukin Iono Ionomycin kg Kilogramm KMT Knochenmarktransplantation LPS Lipopolysaccharid		, g .		
GM-CSF Granulocyte-Monocyte-colony stimulating factor (engl., Granulozyten-Monozyten Kolonie stimulierender Faktor) GVH Graft-versus-host (engl. Transplantat-gegen-Wirt) GVHD Graft-versus-host-Disease (engl., Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung) GVL Graft-versus-Leukemia (engl., Transplantat-gegen-Leukämie) h	G-CSF			
Granulozyten-Monozyten Kolonie stimulierender Faktor) GVH Graft-versus-host (engl. Transplantat-gegen-Wirt) GVHD Graft-versus-host-Disease (engl., Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung) GVL Graft-versus-Leukemia (engl., Transplantat-gegen-Leukämie) h hours (engl., Stunden) HHV Humanes Herpesvirus HLA Histokompatibilitätsantigen (engl. histocompatibility antigen) HSC Hämatopoetische Stammzelle IFA Immun-Fluoreszenz-Assay (engl.) IFN Interferon Ig Immunglobulin IgE Immunglobulin E IgG Immunglobulin G IL Interleukin Iono Ionomycin kg Kilogramm KMT Knochenmarktransplantation LPS Lipopolysaccharid		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		
GVH Graft-versus-host (engl. Transplantat-gegen-Wirt) GVHD Graft-versus-host-Disease (engl., Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung) GVL Graft-versus-Leukemia (engl., Transplantat-gegen-Leukämie) h hours (engl., Stunden) HHV Humanes Herpesvirus HLA Histokompatibilitätsantigen (engl. histocompatibility antigen) HSC Hämatopoetische Stammzelle IFA Immun-Fluoreszenz-Assay (engl.) IFN Interferon Ig Immunglobulin IgE Immunglobulin E IgG Immunglobulin G IL Interleukin Iono Ionomycin kg Kilogramm KMT Knochenmarktransplantation LPS Lipopolysaccharid	GM-CSF			
GVHD Graft-versus-host-Disease (engl., Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung) GVL Graft-versus-Leukemia (engl., Transplantat-gegen-Leukämie) h hours (engl., Stunden) HHV Humanes Herpesvirus HLA Histokompatibilitätsantigen (engl. histocompatibility antigen) HSC Hämatopoetische Stammzelle IFA Immun-Fluoreszenz-Assay (engl.) IFN Interferon Ig. Immunglobulin IgE Immunglobulin G IL Interleukin Iono Ionomycin kg Kilogramm KMT Knochenmarktransplantation LPS Lipopolysaccharid				
Erkrankung) GVL Graft-versus-Leukemia (engl., Transplantat-gegen-Leukämie) h hours (engl., Stunden) HHV Humanes Herpesvirus HLA Histokompatibilitätsantigen (engl. histocompatibility antigen) HSC Hämatopoetische Stammzelle IFA Immun-Fluoreszenz-Assay (engl.) IFN Interferon Ig Immunglobulin IgE Immunglobulin E IgG Immunglobulin G IL Interleukin Iono Ionomycin kg Kilogramm KMT Knochenmarktransplantation LPS Lipopolysaccharid		, e i i i i i i i i i i i i i i i i i i		
GVL Graft-versus-Leukemia (engl., Transplantat-gegen-Leukämie) h hours (engl., Stunden) HHV Humanes Herpesvirus HLA Histokompatibilitätsantigen (engl. histocompatibility antigen) HSC Hämatopoetische Stammzelle IFA Immun-Fluoreszenz-Assay (engl.) IFN Interferon Ig Immunglobulin IgE Immunglobulin E IgG Immunglobulin G IL Interleukin Iono Ionomycin kg Kilogramm KMT Knochenmarktransplantation LPS Lipopolysaccharid	GVHD	. Graft-versus-host-Disease (engl., Transplantat-gegen-Wirt		
h				
h	GVL	. Graft-versus-Leukemia (engl., Transplantat-gegen-Leukämie)		
HLA Histokompatibilitätsantigen (engl. histocompatibility antigen) HSC Hämatopoetische Stammzelle IFA Immun-Fluoreszenz-Assay (engl.) IFN Interferon Ig Immunglobulin IgE Immunglobulin E IgG Immunglobulin G IL Interleukin Iono Ionomycin kg Kilogramm KMT Knochenmarktransplantation LPS Lipopolysaccharid				
HLA Histokompatibilitätsantigen (engl. histocompatibility antigen) HSC Hämatopoetische Stammzelle IFA Immun-Fluoreszenz-Assay (engl.) IFN Interferon Ig Immunglobulin IgE Immunglobulin E IgG Immunglobulin G IL Interleukin Iono Ionomycin kg Kilogramm KMT Knochenmarktransplantation LPS Lipopolysaccharid	HHV	. Humanes Herpesvirus		
HSC Hämatopoetische Stammzelle IFA Immun-Fluoreszenz-Assay (engl.) IFN Interferon Ig Immunglobulin IgE Immunglobulin E IgG Immunglobulin G IL Interleukin Iono Ionomycin kg Kilogramm KMT Knochenmarktransplantation LPS Lipopolysaccharid		<u> </u>		
IFA Immun-Fluoreszenz-Assay (engl.) IFN Interferon Ig. Immunglobulin IgE Immunglobulin E IgG Immunglobulin G IL Interleukin Iono Ionomycin kg Kilogramm KMT Knochenmarktransplantation LPS Lipopolysaccharid				
IFN Interferon Ig. Immunglobulin IgE Immunglobulin E IgG Immunglobulin G IL Interleukin Iono Ionomycin kg Kilogramm KMT Knochenmarktransplantation LPS Lipopolysaccharid		<u> </u>		
Ig. Immunglobulin IgE. Immunglobulin E IgG. Immunglobulin G IL. Interleukin Iono. Ionomycin kg. Kilogramm KMT. Knochenmarktransplantation LPS. Lipopolysaccharid				
IgE Immunglobulin E IgG Immunglobulin G IL Interleukin Iono Ionomycin kg Kilogramm KMT Knochenmarktransplantation LPS Lipopolysaccharid				
IgG Immunglobulin G IL Interleukin Iono Ionomycin kg Kilogramm KMT Knochenmarktransplantation LPS Lipopolysaccharid				
IL Interleukin Iono Ionomycin kg Kilogramm KMT Knochenmarktransplantation LPS Lipopolysaccharid				
Iono				
kgKilogramm KMTKnochenmarktransplantation LPSLipopolysaccharid				
KMT				
LPSLipopolysaccharid				
· · ·		_		
mAo monocional Antibody (engl., monokionaler Antikorper)		·		
	III/AU	. monocional Antibody (engl., monokionalei Antikorpei)		

Abkürzungsverzeichnis

MC-SF	Macrophagen Colony Stimulating Factor (engl., Makrophagen	
	Kolonie stimulierender Faktor)	
min	Minuten	
ml		
mM		
	messenger Ribonukleinsäure	
	Nuclear Factor of Activation in T cells (engl., Kern Faktor der	
Aktivierung in T-Zellen)		
	Nuclear Factor kappa B (engl., Kern Faktor kappa B)	
NK-Zelle		
	National Marrow Donor Program	
	Non-Obese-Diabetic/Severe Combined Immundeficiency (engl.)	
p.I		
•	Peripheral Blood (engl., Peripheres Blut)	
	Peripheral Blood (engl., Templieres Blut) Peripheral Blood Leucocytes (engl., Peripheres Blut Leukozyten)	
	Peripheral Blood Mononuclear Cells (<i>engl.</i> , Peripheres Blut Leukozyten)	
I D-IVII VC	mononukleäre Zellen)	
PBS	Phosphate buffered saline (<i>engl.</i> , Phosphat gepufferte Salzlösung	
	Peripheral Blood Stem Cells (<i>engl.</i> , Periphere Blut Stammzellen)	
	Polymerase Chain Reaction (engl., Polymerasekettenreaktion)	
PE		
	Peridin Chlorophyll Protein	
PHA		
	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (=TPA)	
	Rezeptor der Komplement-Aktivierung	
RT		
	•	
II-PCK	real time Polymerase Chain Reaction (<i>engl.</i> , Echt-Zeit	
sec	Polymerasekettenreaktion)	
	Sideward Scatter (engl., Seitwärtsstreuung)	
STAW	<u> </u>	
	T cell receptor (engl., T-Zell-Rezeptor)	
TGF		
Th		
TNF		
	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate	
I KM	Transplantat Related Mortality(engl., Transplantat bezogene	
T.ID	Mortalität)	
VB		
vgl	_	
VS		
VT	Volumenteile	

1. Einleitung

Leukämien, Blutbildungsstörungen und maligne Lymphome stellen schwerwiegende Erkrankungen dar, bei denen konventionelle Behandlungsmethoden oftmals nicht zum gewünschten Erfolg führen. Daher ist eine Stammzelltransplantation in vielen Fällen die einzige Chance für Patienten auf eine vollständige Heilung.

Die Stammzelltransplantation als eine Therapie hämatologischer Erkrankungen wird jedoch häufig durch eine Graft-versus-host-disease (GVHD) limitiert. Sowohl die GVHD selbst, als auch die lang andauernde immunsuppressive Therapie zur Vorbeugung einer GVHD, führen vielfach zu einer immunologischen Dysfunktion. Bei Nabelschnurbluttransplantationen tritt im Vergleich zu Knochenmarktransplantationen (KMT) eine GVHD seltener auf, ohne den therapeutischen Nutzen herabzusetzen. Dies beruht insbesondere auf Unterschieden bei den T-Zellen.

Nabelschnurblut und adultes Blut unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht, z.B. bezüglich des Gehaltes an Stammzellen und löslichen Mediatoren (Zytokine, Chemokine), exprimierter Oberflächenantigene und Transkriptionsfaktoren (TF), Reifegrad der Zellen, etc. Während sich peripheres Blut durch einen hohen Anteil reiferer Zellen auszeichnet, besitzt Nabelschnurblut eine hohe Anzahl an immunologisch "naiven" Zellen, d.h. die Abwehrfunktion des Immunsystems ist noch nicht entwickelt. Der Reifegrad der Zellen ist für ein unterschiedliches Zytokinmuster der Zellen verantwortlich. Dies führt in Nabelschnurblut zu weniger proinflammatorischen Zytokinen und mehr anti-inflammatorischen Zytokinen, was das Auftreten oder die Ausprägung einer GVHD vermindern kann.

Der Erfolg einer Stammzelltransplantation kann zusätzlich durch Herpesviren beeinträchtigt sein. Infektionen mit Herpesviren finden häufig im Kindesalter statt, führen aber selten zu Komplikationen. Die Viren persistieren jedoch meist lebenslang latent im Organismus und können bei Menschen mit gestörtem Immunsystem reaktiviert werden. Eines dieser Viren ist das humane Herpesvirus 6 (HHV-6). In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass einer Infektion mit Herpesviren eine Induktion von Zytokinen zur Folge hat. Dies führt zu der Annahme, dass eine Myelosuppression auf direktem Wege über eine von HHV-6 veränderte Zytokin-Sekretion bewirkt werden kann.

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Klärung der Unterschiede der Lymphozytenpopulationen, Zytokinmuster und deren Transkriptionsfaktoren in Nabelschnurblut und adultem Blut leisten, sowie den Einfluss einer HHV-6 Infektion auf diese Vorgänge ermitteln.

1.1 Die humane Hämatopoese

Das Wort Hämatopoese leitet sich aus dem Griechischem *haima* (Blut) und *poiesis* (Bildung) ab. Die Blutbildung erfolgt während der Embryonalentwicklung zunächst in mesodermalen Blutinseln des Dottersackes (= mesoblastische Blutbildung), später im Embryo in Mesenchymzellen der Leber und Milz (= hepatolienale Blutbildung) und ab dem 6. Monat auch im Mesenchym des Knochenmarks (= myelopoetische Blutbildung) (Reiche, 2003). Im gesunden Erwachsenen findet die Hämatopoese ausschließlich im Knochenmark und in den lymphatischen Organen statt (Abb. 1). Hämatopoetisch aktive Strukturen sind durch ein Netzwerk von Stromazellen gekennzeichnet, in welche die blutbildenden Zellen eingebettet sind. Die morphologisch erkennbaren Gebiete aktiver Hämatopoese werden als "Cobblestone area" (*engl.*, Pflastersteingebiet) bezeichnet. Alle gebildeten Blutzellen leiten sich von einem kleinen gemeinsamen Pool von totipotenten Zellen ab, die als pluripotente hämatopoetische Stammzellen (HSC) bezeichnet werden (Ibelgauft, 2007).

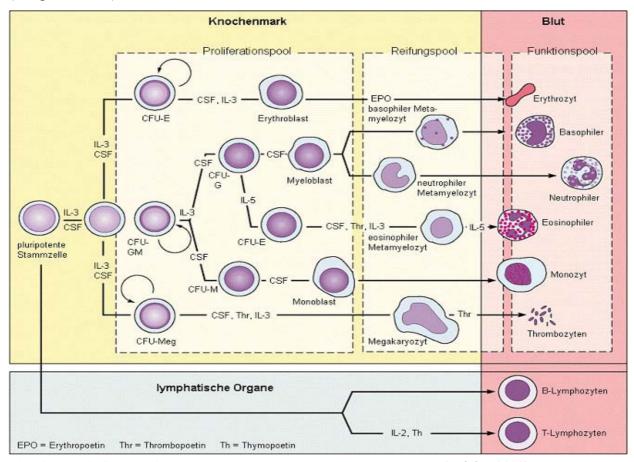


Abbildung 1: Schematische Darstellung der humanen Hämatopoese (Reiche, 2003)

1.1.1 Die hämatopoetische Stammzelle

Die hämatopoetischen Stammzellen sind totipotente Zellen mit einer Fähigkeit zur Selbsterneuerung, für die Aufrechterhaltung des Stammzellvorrates, und zur Differenzierung in verschiedene hämatopoetische Zellreihen. Sie differenzieren sich zu einer Vielfalt von Vorläuferzellen (z.B. CFU (Colony forming units), CFC (Colony forming cells)). Je nach Art des Wachstumsfaktors, der die Stammzelle stimuliert, entwickeln sich aus ihr Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten und Lymphozyten. Normalerweise ruht die Mehrzahl der Stammzellen und nur wenige zirkulieren im Blutkreislauf. Man kann sie aber durch den Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (*engl.* Granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF) mobilisieren, so dass der Stammzellgehalt im peripheren Blut steigt, was im Rahmen der Stammzelltransplantation genutzt wird (Ibelgauft, 2007).

1.1.2 Das Zelloberflächen-Antigen CD34

Der Stammzellgehalt wird anhand des Zelloberflächen-Antigens CD34 bestimmt. CD34 ist selektiv auf Vorläuferzellen der humanen Hämatopoese exprimiert. Die biologische Funktion ist immer noch nicht ausreichend geklärt. Es ist ein Oberflächenmarker für frühe hämatopoetische Stammzellen (Ibelgauft, 2007). Der Stammzellgehalt des Nabelschnurblutes ist mit 2% in der Literatur ähnlich hoch beschrieben wie in peripherem Blut (2,1%) (Michejda, 2004; Wu et al., 1999). Den höchsten Stammzellgehalt findet man in fetalem Knochenmark. Mit zunehmender Zellreifung verschwindet die Expression von CD34.

1.1.3 Die Steuerung der humanen Hämatopoese

Hämatopoetische Wachstumsfaktoren, die koloniestimulierenden Faktoren (*engl.* Colony stimulating factors, CSF) üben einen stimulierenden Effekt auf Differenzierung und Proliferation der Blutzellen aus. Es sind kleine Peptide, die als Parakrine u.a. aus den Makrophagen des Knochenmarkes freigesetzt und vor Ort wirksam werden. Darüber hinaus sind an der Blutbildung eine Reihe anderer Hormone, u.a. Katecholamine, Steroidhormone, Schilddrüsen- und Wachstumshormone beteiligt. Bei verschiedenen Schritten der Determinierung wirken die Wachstumsfaktoren G-CSF, M-CSF (Monocyte-Colony stimulating factor) sowie die Interleukine (IL) IL-3 und IL-5 stimulierend. Die Lymphozytenbildung erfolgt aus den pluripotenten Stammzellen unter Einwirkung von IL-2 und Thymopoetin in den lymphatischen Organen (Reiche, 2003).

Lymphozyten exprimieren verschiedene Oberflächenmarker, an denen sich jede Lymphozytensubpopulation mittels monoklonaler Antikörper gegen diesen Oberflächenmarker eindeutig

bestimmen lässt. In der Tabelle 1 sind Oberflächenmarker (Cluster of differenciation, CD) aufgeführt, die in dieser Arbeit betrachtet wurden.

Tabelle 1: Lymphozyten-Oberflächenmarker

Rezeptor	Struktur	Vorkommen	Funktion
CD3	Immunglobulin- Supergenfamilie	naive T-Zelle, T-Gedächtniszelle	Erkennung des Antigens und Aktivierung der T-Zelle, Signaltransduktion, bei Expressionsstörungen entsteht Immunschwäche
CD4	Immunglobulin- Supergenfamilie	T-Helferzellen	Korezeptor in MHC II beschränkter Antigen induzierter T-Zell Aktivierung, Regulation der T-/B-Lymphozyten Adhäsion Signaltransduktion
CD28	Homodimer Typ I, transmembranes Glycoprotein	Periphere T- Lymphozyten, Plasmazellen	Kostimulation der T-Zell Proliferation und Zytokin Produktion T-Zell abhängige Antikörperproduktion; wenn CD28 ↓, dann humorale Immunität ↓
CD45		CD45Ro = Gedächtnis-T- Zelle CD45Ra = naive T-Zelle	Entscheidende Voraussetzung für T- und B- Zell Antigenrezeptor vermittelte Aktivierung; Zielrezeptor bei immunsuppressiver Antikörper Behandlung

(Janeway et al., 2002; Ibelgauft, 2007)

1.2 Zytokine/Wachstumsfaktoren

1.2.1 Allgemeines

Zytokine sind kleine, lösliche Proteine, die von einer Zelle gebildet werden und das Verhalten oder die Eigenschaften dieser oder einer anderen Zelle verändern. Sie spielen u.a. eine zentrale Rolle bei der Immunantwort. Zytokine werden in verschiedene Gruppen eingeteilt wie Interleukine, Interferone, Hämatopoetine, Tumornekrosefaktoren, Tumorwachstumsfaktoren und Chemokine (Janeway et al., 2002).

Die Zytokinproduktion von Th1- und Th2-Zellen wurden zunächst bei Maus CD4⁺ Zellklonen beschrieben (Cherwinski et al., 1987; Mosmann et al., 1986), später aber auch bei humanen T-Zellen (Del Prete et al., 1991). Die Funktionen von Th1- und Th2-Zellen lässt sich auf ihre unverwechselbare Zytokinexpression zurückführen, weshalb die Einteilung in dieser Arbeit in T-Helfer 1 (Th1), T-Helfer 2 (Th2) und hämatopoetisch spezifische Zytokine erfolgt.

1.2.2 Th1-Zellen

Th1-Zellen sind für die zelluläre Immunität verantwortlich. Sie aktivieren Makrophagen und sezernieren Interferon-gamma (IFN-γ), Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-Stimulations-Faktor (GM-CSF), Tumornekrose-Faktor-alpha (TNF-α) und andere Effektormoleküle, wie IL-3, Tumornekrose-Faktor-beta (TNF-β) und IL-2 (Tabelle 2). Weiterhin exprimieren sie den membrangebundenen CD40- und/oder den Fas-Ligand. Beide gehören zur TNF-Familie: Der CD40-Ligand aktiviert Zellen; der Fas-Ligand löst den programmierten Zelltod aus (Janeway et al., 2002; Mosmann and Coffman, 1989; Mosmann and Sad, 1996).

Tabelle 2: Th-spezifische Zytokine

Tabelle 2: In-spezifische Zytokine			
Zytokin	Expression durch	Funktion	
IL-2	Th0, Th1- und einigen zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) produziert	 Ruhende T-Zellen exprimieren einen IL-2-Rezeptor, der nur aus β- und γ- Ketten besteht und eine geringe Affinität zu IL-2 aufweist (CD45RA) Aktivierte T-Zellen exprimieren einen IL-2-Rezeptor, der aus 3 Ketten (α-, β- und γ-Kette) besteht und dadurch eine höhere Affinität zum IL-2 hat (CD45Ro) Transkriptionsfaktoren werden induziert, wie NF-AT (nuclear factor of activation in T cells), der an die Promotorregion des IL-2-Gens bindet und für die Transkriptionsaktivierung notwendig ist. All dies führt zu einer gesteigerten IL-2 Produktion Cyclosporin A und Tacrolimus hemmen die IL-2-Produktion, indem sie die Signalgebung über den T-Zell-Rezeptor unterbrechen, Rapamycin verhindert dagegen die Signalgebung über den IL-2-Rezeptor IL-2 induziert klonale Expansion der naiven T-Zelle und die Differenzierung ihrer Nachkommen zu aktivierten T-Effektorzellen. Stimuliert die Proliferation der aktivierten B-Zelle, stimuliert das Wachstum von T-Zellen und natürliche Killerzellen (NK), verstärkt die Freisetzung weiterer Zytokine (IFN-γ, IL-1 TNF-α, TNF-β) 	
IFN-γ	Th1-Zellen und CTLs	 Besitzt antivirale und antiparasitäre Aktivität Führt zur Differenzierung von B-Zellen und zur IgG2a-Synthese Inaktiviert T-Zellen, aktiviert NK-Zellen Führt zu einem Anstieg der MHC I- und II-Rezeptoren auf Makrophagen und zu deren Aktivierung 	

(Janeway et al., 2002; Ibelgauft, 2007)

1.2.3 Th2-Zellen

Th2-Zellen vermitteln die humorale Immunität. Durch Expression des CD40-Liganden regen sie B-Zellen zur Proliferation an. Weiterhin sezernieren sie IL-4, IL-5, IL-3, GM-CSF, IL-10 und TGF-ß (Tumor Growth Factor) (Tabelle 3). Th2-Zytokine werden üblicherweise bei starken Antikörperreaktionen und Allergien nachgewiesen. Nur Th2-Zellen sezernieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 (Janeway et al., 2002; Mosmann and Coffman, 1989; Mosmann and Sad, 1996).

Tabelle 3: Th2-spezifische Zytokine

Tabelle 3: Th2-spezifische Zytokine			
Zytokin	Expression durch	Funktion	
IL-4	nur Th2-Zellen	 Ist für die Aktivierung und die Expansion von B-Zellen verantwortlich, induziert die Bildung von MHC II-Rezeptoren, IgG1, IgE Ist für das Wachstum und Überleben von T-Zellen verantwortlich, hemmt die Makrophagenaktivierung, fördert das Wachstum von Mastzellen 	
IL-5	Th2-Zellen	 Fördert die Differenzierung von B-Zellen, ist für die IgA-Synthese verantwortlich Fördert das Wachstum und die Differenzierung von Eosinophilen, die an der späten Phase der allergischen Reaktion beteiligt sind 	
IL-10	Th2-Zellen	 Führt zu einem Anstieg der MHC II-Rezeptoren auf B-Zellen Hemmt die Wirkung von Th1-Zellen und die Zytokinfreisetzung in Makrophagen Kostimuliert das Wachstum von Mastzellen 	
IL-13	Th2-Zellen	 Moduliert die Aktivität der Makrophagen, d.h. reduziert die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen Vermindert die Produktion von Nitritoxid aktivierten Makrophagen, was zu einer Verminderung der parasitären Aktivität führt Induziert die Monozytendifferenzierung und die Differenzierung und Proliferation von B-Zellen 	

(Janeway et al., 2002; Ibelgauft, 2007)

1.2.4 Hämatopoetische Zytokine (Hämatopoetine)

Hämatopoetische Zytokine repräsentieren eine Gruppe von Eiweißmolekülen, die ausgehend von der blutbildenden Stammzelle, deren Proliferation, Differenzierung und Ausreifung zu blutbildenden Vorläuferzellen sowie deren Funktion und die Überlebensdauer reifer Blutzellen

steuern können. Abhängig von ihren biologischen Aktivitäten werden die Hämatopoetine in Subgruppen unterteilt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Subgruppen der Hämatopoetine

Subtyp	Funktion	
Typ1	Faktoren, die direkt an Zellen agieren, die für die Regulation der Hämatopoese wichtig sind. Hierzu gehören IL-3 und GM-CSF.	
Typ2	Faktoren, die synergetisch mit CSF wirken, aber keine intrinsische Kolonie stimulierende Aktivität besitzen. Hierzu gehören IL-1, IL-4, IL-5 und IL-6.	
Тур3	Modulieren das hämatopoetische Wachstum, indem sie die Freisetzung von CSFs aktivieren. Hierzu gehören IL-1, IL-2, TNF- β und IFN- γ .	

Moduliert nach (Ibelgauft, 2007)

Den Hämatopoetinen des Subtyps 1 gilt das besondere Interesse dieser Arbeit, da diese, wie oben beschrieben, als einzige direkt an der Zelle agieren.

Tabelle 5 fasst die wesentlichen Merkmale von Hämatopoetinen des Subtyps 1 zusammen.

Tabelle 5: Spezifische hämatopoetische Zytokine (Subtyp 1)

Zytokin	Expression durch	Funktion
IL-3	Th1-, Th2- und einigen CTLs	 Ist ein Wachstumsfaktor für Vorläufer von hämatopoetischen Zellen (Multi-CSF) Stimuliert die Produktion von Makrophagen, Granulozyten und dendritischer Zellen Hilft bei einer Infektion, Effektorzellen zu rekrutieren
GM-CSF	T-Zellen und Makrophagen	 Induziert die Synthese wird von TNF-α, TNF-β, IL-1, IL-2 und IFN Stimuliert das Wachstum von Makrophagen und Granulozyten Stimuliert Myeloblasten und Monoblasten und triggert ihre Differenzierung Lockstoff für Neutrophile Führt zu einem Anstieg mikrobiologischer Aktivität und oxidativem Metabolismus und Phagozytose, erhöht Zytotoxizität der Zellen

(Janeway et al., 2002; Ibelgauft, 2007)

1.2.5 Transkriptionsfaktoren der T-Helfer-Zellen

Es ist bekannt, dass die Differenzierung von T-Helfer-Zellen auf vielen Ebenen reguliert wird. Zum Beispiel spielen Interaktionen von Peptidantigenen mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR), die Signalwirkung von Zytokinen, Aktivitäten von kostimulatorischen Molekülen und Induktion von

Transkriptionsfaktoren wichtige Rollen in der Polarisation von T-Helfer-Zellen (Farrar et al., 2001; Murphy et al., 2000; Ben Sasson et al., 2001).

NF-κB

NF-κB (Nuklear Faktor kappa B) reguliert die Expression von einigen hundert Genen, u.a. für die Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle (Burstein and Duckett, 2003; Ibelgauft, 2007), welche mit verschiedenen Prozessen der Entzündungs- und Immunreaktionen interagieren. Erstmalig wurde NF-κB in Zellkernen von reifen B-Zellen beschrieben (Sen and Baltimore, 1986). Dieser Transkriptionsfaktor wird jedoch nicht ausschließlich in B-Zellen exprimiert, sondern ist in einem inaktiven Zustand in den meisten Zellen zu finden. Eine Aktivierung führt unter anderem zu vermehrter Expression von IL-3, IL-15, GM-CSF und IFN-γ.

Um auf die einzelnen Subgruppen der T-Helfer-Zellen einzugehen, werden hier drei Transkriptionsfaktoren beschrieben, die für die einzelnen Subgruppen spezifisch sind.

T-bet

Die Expression des Transkriptionsfaktors T-bet korreliert mit der Induktion des für Th1-Zellen charakteristischen Zytokins IFN-γ und wird in einer Reihe Zellen gefunden, die IFN-γ bilden, wie CD4⁺-, CD8⁺- und NK-Zellen (Agnello et al., 2003). Die Relevanz von T-bet für die Regulierung der Th1-Zell Differenzierung wurde in Knockout (T-bet ^{-/-}) Mäusen bestätigt: CD4⁺ T-Zellen von Knockout Mäusen haben einen schweren Defekt in der Th1-Immunantwort (Szabo et al., 2002). T-bet stellt somit einen Th- spezifischen Transkriptionsfaktor dar.

GATA-3

Der Transkriptionsfaktor GATA-3 ist in kleinen Mengen in naiven CD4⁺ T-Zellen zu finden. Seine Expression steigt erheblich während der Th2-Differenzierung und sinkt während der Th1 Differenzierung (Lee et al., 1998; Zhang et al., 1997; Zheng and Flavell, 1997). Von GATA-Transkriptionsfaktoren ist bekannt, dass sie sich mit Kofaktoren der sogenannten Friends-of-GATA (FOG) Familie verbinden. Durch Interaktion mit FOG-1 wird die Aktivität von GATA-3 blockiert. Überexpression von GATA-3 in sich entwickelnden Th2-Zellen unterdrückt die Bildung von IL-4 und IL-5 und induziert die Produktion von IFN-γ und die Expression von T-bet (Kurata et al., 2002; Zhou et al., 2001). In der Literatur wird dieser Transkriptionsfaktor in Zusammenhang mit allergischem Asthma beschrieben, wobei er erhöht ist. GATA-3 stellt somit einen Transkriptionsfaktor dar, der mit der Differenzierung von Th2-Zellen korreliert.

Einleitung

c-maf

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der in Th2-Zellen exprimiert wird, nicht aber in Th1-Zellen,

ist c-maf (Ho et al., 1996). Im Gegensatz zu GATA-3 aktiviert c-maf den Promoter von IL-4,

nicht aber den Promoter von IL-5 und IL-13 (Ho et al., 1996; Kim et al., 1999; Kishikawa et al.,

2001). Transgene Mäuse, die c-maf überexprimieren, haben eine erhöhte Produktion von Th2-

Zytokinen und erhöhte Serumwerte von Immunglobulin (Ig) G1 und IgE (Ho et al., 1998). c-maf

stellt somit einen Th2-spezifischen Transkriptionsfaktor dar.

1.3 **Knochenmark- und Stammzelltransplantation**

1.3.1 **Allgemeines**

Eine Reihe von schweren hämatologischen Erkrankungen erfordert eine Transplantation von

Knochenmark oder Stammzellen als potentiell heilende Behandlung. Bei den Erkrankungen han-

delt es sich um Leukämien, Lymphome, Myelome und andere immunologische Defekte.

Die meisten Stammzellen findet man im Knochenmark, aber auch im peripheren Blut und im

Nabelschnurblut befinden sich Stammzellen, die Verwendung für die Transplantation finden.

Es gibt verschiedene Arten von Transplantaten:

autolog: Patienten erhalten ihre eigenen Stammzellen

syngenetisch: Patienten erhalten Stammzellen von ihrem eineigen Zwilling

allogen: Patienten erhalten Stammzellen von verwandten oder fremden Spendern

Ein Histokompatibilitätsantigen (engl. histocompatibility antigen, HLA)-kompatibler Spender ist

der Spender der Wahl für eine Transplantation bei hämatologischen Erkrankungen. Das HLA ist

ein Oberflächenantigen auf allen kernhaltigen Zellen des Körpers, das die Immunantwort gegen

fremdes Gewebe anregt. Nur 30% der Patienten haben einen kompatiblen Spender und die

GVHD kann zu einem entscheidenden Problem für den Empfänger des Transplantates werden

(Vowels et al., 1992). Die GVHD ist eine Abstoßungsreaktion des Transplantates gegen den

Empfänger (Kapitel 1.4).

Die blutbildenden Zellen eines gesunden Spenders ersetzen die kranken Zellen des Patienten und

übernehmen deren Aufgaben. Das Transplantat hat aber noch eine weitere wichtige Funktion: Es

kann die Krebszellen angreifen und versucht sie zu vernichten. Bei dieser sogenannten Graft-

versus-Leukemia (GVL) Reaktion greifen mit dem Spendermark übertragene Abwehrzellen wie

9

Lymphozyten oder Monozyten noch im Körper des Patienten verbliebene Tumorzellen an und

töten diese ab. Bislang ist nicht hinreichend geklärt, wie es zu diesem Effekt kommt.

1.3.2 Gewinnung von Stammzellen

Knochenmark

Dem Spender wird in Anästhesie Knochenmark aus dem Beckenkamm entnommen (in Einzelfällen auch aus dem Sternum). Das gewonnene Knochenmark wird von Knochenfragmenten und unerwünschten Blutbestandteilen gereinigt und zum Konservieren eingefroren.

Periphere Blutstammzellen (PBSC)

Da in peripherem Blut viel zu wenig Stammzellen enthalten sind, wird dem Patienten zunächst G-CSF gegeben, um die Stammzellen aus dem Knochenmark zu mobilisieren. Mittels Leukapherese mit einem Zellseparator oder durch reversible Adhäsion an Nylonfasern (Filtrationsleukapherese) werden dann die Stammzellen gewonnen. Die verbleibenden Blutbestandteile (Plasma, Erythrozyten) können in den Spender zurückgeführt werden.

Nabelschnurblut (Cord Blood, CB)

Das Nabelschnurblut wird direkt im Anschluss an die Geburt des Kindes durch Punktion der Nabelvene gewonnen und eingefroren. Hieraus entsteht weder ein Risiko für das Kind, noch für die Mutter. Der Anteil der Stammzellen im Blut einer Nabelschnur ist sehr hoch, jedoch ist die zu gewinnende Menge relativ gering. Daher besteht zum heutigen Zeitpunkt nur die Möglichkeit der Transplantation bei Kindern bis zu einem Körpergewicht von ca. 25 kg.

1.3.3 Transplantationsprocedere

Zuerst erfolgt die Konditionierung des Patienten eine Woche vor der Transplantation. Diese dient der Inaktivierung des Immunsystems und zur Vernichtung aller malignen Zellen. Erreicht wird dies mit einem Regime aus verschiedenen Zytostatika (z.B. Cyclophosphamid, Busulfan, Cytarabin, Etoposid, etc.) und/oder Bestrahlung mit einem Linearbeschleuniger. Die Gesamtdosis der Bestrahlung von 12 Gray (1200 rad) wird auf 3 Tage verteilt verabreicht. Bei der eigentlichen Transplantation werden dem Patienten Stammzellen intravenös infundiert.

Weiterhin existiert die Variante der "Minitransplantation", bei der durch weniger Medikation, geringere Dosen und niedrigere Bestrahlung nur ein Teil der Zellen vernichtet wird. Diese Alter-

native eignet sich insbesondere bei bestimmten, langsam verlaufenden hämatopoetischen Erkrankungen und fortgeschrittenem Alter.

Die Verwendung von allogenen hämatopoetischen Stammzellen zur Transplantation wird von entscheidenden Faktoren limitiert: 1. fehlende Verfügbarkeit von Spendern, 2. die Dauer der Suche nach einem Fremdspender für Knochenmark (3,7 Monate im Durchschnitt im NMDP (National Marrow Donor Program) Netzwerk), 3. die Komplikation von GVHD und die verzögerte Wiederherstellung des Immunsystems, was zu opportunistischen Infektionen und Transplantat bezogener Mortalität führt (Barker and Wagner, 2003b).

1.3.4 Vor- und Nachteile von Nabelschnurblut für die Transplantation

Seit der ersten erfolgreichen Transplantation hämatopoetischer Stammzellen aus Nabelschnurblut 1988, wurden weltweit Blutbanken gegründet, um Nabelschnurblut als Alternative zum Knochenmark für Transplantationen bereitzustellen (Gluckman, 1989). Die Vorteile von Nabelschnurblut für die Transplantation sind: 1. unmittelbare Verfügbarkeit, 2. das fehlende Risiko für den Spender und 3. das geringe Risiko Infektionen zu übertragen. Ein weiterer großer Vorteil von Nabelschnurblut gegenüber Knochenmark ist das geringere Risiko der GVHD. Die Eigenschaften der immunologisch unreifen Lymphozyten des Nabelschnurblutes (Garderet et al., 1998; Harris et al., 1992; Risdon et al., 1994; Roncarolo et al., 1994), experimentelle Ergebnisse (de La Selle et al., 1998) und die klinische Erfahrung (Gluckman et al., 1997; Wagner et al., 1996) zeigen, dass das Risiko einer GVHD nach Nabelschnurblut-Transplantation geringer ist als nach KMT.

In *in vitro* Studien konnte verdeutlicht werden, dass der Anteil unreifer, koloniebildender Zellen im Nabelschnurblut erheblich höher ist, als im Knochenmark (de Wynter et al., 1995). Dies wurde auch im *in vivo* Modell der NOD/SCID Maus gezeigt (Zhang et al., 2002).

Eines der schwierigsten Probleme ist die Bereitstellung von ausreichend CD34⁺ Zellen. Studien ergaben, dass die Transplantat abhängige Mortalitätsrate (*engl*. transplantat related mortality, TRM) nach einem Jahr von der infundierten Zahl der CD34⁺ Zellen abhängig ist (<1,7 CD34⁺ Zellen/kg 68% TRM; >2,7 CD34⁺ Zellen/kg 15% TRM) (Wagner et al., 2002). Als zukunftsweisender Weg gilt daher die *ex vivo* Expansion von Stammzellen aus Nabelschnurblut (Pick et al., 1998) oder die gleichzeitige Transfusion des Nabelschnurblutes von verschiedenen Spendern (Barker et al., 2001; De Lima et al., 2002). Die Vor- und Nachteile von Nabelschnurblut für die Transplantation sind nachfolgend kurz tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 6).

Tabelle 6: Vor- und Nachteile von Nabelschnurblut für Transplantationen

Vorteile	Nachteile
 Schnelle Verfügbarkeit Weniger HLA-Einschränkungen, da 1-2 mismatches erlaubt sind Weniger GVHD Fehlendes Spenderrisiko Geringere alloantigen- und mitogenspezifische T-Zell- Proliferation Geringere inflammatorische Zytokinproduktion Gesteigerte Empfindlichkeit gegen Toleranzentwicklung 	 Weniger Erfahrung Zeitversetzte Transplantation Keine erneute Gabe des Spenders für einen "Boost" Potentielle Übertragung von genetischen Erkrankungen Weniger CD34⁺-Zellen als im Knochenmark

(Barker and Wagner, 2003a; Cohen and Nagler, 2004; Mills et al., 1996; Rocha et al., 2000; Sutherland et al., 1994)

1.3.5 Vergleich Nabelschnurblut versus peripheres Blut

Nabelschnurblut und peripheres Blut unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht, z.B. bezüglich des Gehaltes an Stammzellen und löslicher Mediatoren (Zytokine, Chemokine), der Expression der Oberflächenantigene und Transkriptionsfaktoren, Reifegrad der Zellen, etc.

Nabelschnurblut besitzt eine hohe Anzahl an naiven Zellen, die sich durch den Oberflächenmarker CD45Ra auszeichnen. Peripheres Blut enthält eine geringere Anzahl von CD45Ra positiven Zellen und zeichnet sich durch einen hohen Anteil von CD45Ro positiven Zellen aus, die in Nabelschnurblut fast nicht vorhanden sind (Bradstock et al., 1993; Chalmers et al., 1998; Cohen and Madrigal, 1998; Cohen et al., 1999; D'Arena et al., 1998; Keever, 1993; Rabian-Herzog et al., 1992; Sautois et al., 1997).

Der Reifegrad der Zellen ist für ein unterschiedliches Zytokinmuster der Zellen verantwortlich. Cohen et al. gehen davon aus, dass naive T-Zellen die Fähigkeit haben mehr IL-10 und weniger IL-2 zu bilden, was zur Abschwächung der GVHD führen würde. Außerdem finden sich im Nabelschnurblut weniger IL-2, IL-4, IFN-γ (Kilpatrick et al., 2004) und TNF-α, was auch Ursache für die verminderte GVHD sein kann (Chalmers et al., 1998; Cohen and Madrigal, 1998; Cohen et al., 1999; Gardiner et al., 1998; Krampera et al., 2000; Roncarolo et al., 1994). Somit wird angenommen, dass im Nabelschnurblut weniger pro-inflammatorische Zytokine und mehr anti-inflammatorische Zytokine vorhanden sind.

1.4 Graft-versus-host-disease (GVHD)

1.4.1 Definition und Äthiologie

Die GVHD ist eine der größten Komplikationen bei der allogenen KMT. Normalerweise resultiert aus einem Transfer von Gewebe in ein fremdes Individuum eine Abstoßungsreaktion gegen das fremde Gewebe, was zu dessen Zerstörung führt und als host-versus-graft Reaktion bezeichnet wird. Die immunkompetente Zelle des fremden Gewebes kann ebenso eine immunologische Reaktion gegen den Wirt hervorrufen, die man graft-versus-host (GVH) Reaktion nennt. Dieses Phänomen ließ sich erstmals beobachten, als bestrahlten Mäusen Milzzellen infundiert wurden. Obwohl sich die Mäuse von der Bestrahlung und der Aplasie erholten, traten Symptome wie Diarrhöe, Gewichtsverlust, Hautveränderungen und Leberabnormalitäten auf, an deren Folgen die Mäuse starben (van Bekkum et al., 1967).

Diese Beobachtungen veranlassten Billingham 1966, die Voraussetzungen für die Entwicklung einer GVHD zu formulieren (Billingham, 1966): Erstens muss das Transplantat immunkompetente Zellen enthalten. Die erste Voraussetzung für eine GVH Reaktion ist das Vorhandensein von reifen T-Zellen im Knochenmark (Korngold and Sprent, 1987). Klinische Studien mit umfassendem Datenmaterial zeigen, dass die Ausprägung der GVHD mit der Anzahl der transfundierten Spender-T-Zellen korreliert (Kernan et al., 1986). Zweitens muss der Empfänger unfähig sein, eine effektive Immunantwort auf das Transplantat zu geben, um es zu zerstören. Drittens exprimiert der Empfänger Gewebsantigene, die nicht im Spendertransplantat enthalten sind. Somit kann eine GVHD in vielfältigen klinischen Situationen auftauchen, wenn Gewebe mit immunkompetenten Zellen (Blut, Knochenmark, solide Organe) zwischen Individuen transferiert wird.

Sowohl die Entstehung einer akuten oder chronischen GVHD, als auch die Immunsuppression zur Prophylaxe von GVHD, stellen einen hohen Risikofaktor für bakterielle, virale und Pilzinfektionen dar (Ringden, 1997).

1.4.2 Akute GVHD

Ohne prophylaktische Immunsuppression tritt in den meisten allogenen KMT als Komplikation eine GVHD auf. Die GVHD kann in den ersten Tagen nach Transplantation auftreten, aber auch erst ein bis zwei Monate danach. Es werden Häufigkeiten von 10% bis zu über 80%, abhängig vom Grad der Histokompatibilität, des Alters des Patienten, der Menge der T-Zellen im Transplantat und dem prophylaktischen Regime beobachtet (Deeg and Henslee-Downey, 1990).

Die Zielorgane der GVHD sind das Immunsystem, die Leber, die Haut und der Gastrointestinaltrakt. Üblicherweise tritt zuerst ein juckender, makulopapulöser Ausschlag an Handflächen, Fußsohlen und Ohren auf, der sich auf den ganzen Körper ausbreiten und mit Blasenbildung bis hin zur völligen Hautablösung einhergehen kann. Später treten gastrointestinale
Symptome wie Erbrechen, Übelkeit, Durchfall mit Blutbeimengung, abdominelle Schmerzen bis
zum paralytischen Ileus hinzu. Hepatische Symptome sind seltener und treten auf als Hyperbilirubinämie, Aszites, verlängerte Blutungszeit bis hin zur Enzephalopathie (Ferrara and Deeg,
1991). Transfusions-induzierte GVHD tritt typischerweise 6 bis 10 Tage nach der Transfusion
auf (Spitzer et al., 1990).

Man unterscheidet die GVHD in 4 Schweregrade (Grad I-IV). Bei milder GVHD (Grad I-II) ist die Morbidität gering und es existiert fast keine Mortalität, jedoch liegt die Mortalität der GVHD Grad IV bei nahezu 100 Prozent.

1.4.3 Die Rolle von Zytokinen in der akuten GVHD

Es konnte gezeigt werden, dass die Ausprägung und Häufigkeit der GVHD mit der vermehrten Synthese von pro-inflammatorischen Th1-Zytokinen zusammenhängt, während anti-inflammatorische Th2-Zytokine die GVHD vermindern (Dickinson et al., 1994; Krenger and Ferrara, 1996). Die Dysregulation der Zytokine während einer GVHD lässt sich in 3 Phasen einteilen (Abb. 2).

Phase 1: Konditionierung

Unter Konditionierung versteht man die der allogenen Stammzelltransplantation vorgeschaltete Chemotherapie und Bestrahlung. Diese sind entscheidend an der Entstehung einer GVHD beteiligt. Erstens werden durch die Bestrahlung inflammatorische Zytokine ausgeschüttet, zweitens werden durch das medikamentöse Konditionierungs-Regime die Schleimhäute des Gastrointestinaltraktes geschädigt, was Endotoxine und Lipopolysaccharide (LPS) durch den bakteriellen Zerfall freisetzt. Klinisch wird das erhöhte Niveau von TNF-α während der Phase 1 für die Ernsthaftigkeit der Komplikationen und die Überlebenschancen nach KMT verantwortlich gemacht (Holler et al., 1990; Remberger et al., 1995).

Phase 2: T-Zell Aktivierung

Während der zweiten Phase werden die T-Zellen des Spenders aktiviert. Aktivierte T-Zellen sezernieren etliche Zytokine, verherrschend sind dabei IL-2 und IFN-γ (Th1-Zytokine), die von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gebildet werden (Mosmann et al., 1986; Seder and Le Gros, 1995).

IL-2 und IFN- γ sind entscheidende Mediatoren der akuten GVHD. Sie kontrollieren und verstärken die Immunantwort gegen Alloantigene (Lichtman A. et al., 1997) und induzieren zytotoxische T-Lymphozyten und NK-Zellen. Weiterhin regen sie Monozyten zur Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-1, TNF- α) an.

Phase 3: Inflammatorischer Mechanismus

Die dritte Phase der akuten GVHD besteht aus einer komplexen Kaskade von multiplen Effektoren. Dazu gehört die Ausschüttung von etlichen Zytokinen, spezifische Zytotoxizität gegen den Empfänger durch CTL's via Fas und Perforin-Übertagungsweg (Braun et al., 1996; Baker et al., 1996), NK-Zellen (Ferrara et al., 1986) und Stickstoffoxid (Hoffman et al., 1995). IL-2 aktiviert weitere transplantierte mononukleäre Zellen, die ihrerseits inflammatorische Zytokine sezernieren, wie IL-1, TNF-α, IFN-γ, bis es zum Organversagen kommt (Antin and Ferrara, 1992).

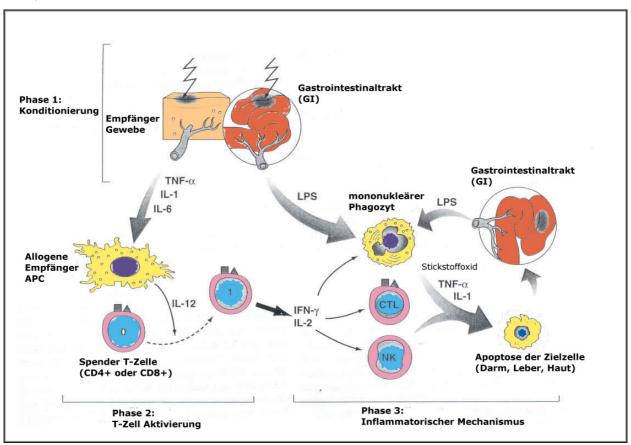


Abbildung 2: Die Immunpathophysiologie der GVHD (Hill et al., 1997)

1.4.4 Chronische GVHD

Anfangs wurde die chronische GVHD als Syndrom definiert, das innerhalb von 100 Tagen nach Transplantation auftritt - als Verlängerung der akuten GVHD (Progressive Form), nach einem erkrankungsfreien Intervall (Ruhige Form) oder ohne vorangehende Symptome (de novo) (Sullivan et al., 1981). Die Inzidenz der GVHD reicht von 30-60% (Ferrara and Deeg, 1991). Spezifische Veränderungen beeinflussen die zelluläre Immunität: Abnahme der Proliferation von B-Zellen, Beeinträchtigung der Antikörperproduktion gegen bestimmte Antigene, Defekte in der Anzahl und Funktion der CD4⁺ T-Zellen und ein Anstieg von nicht spezifischen Suppressor-Zellen.

Die chronische GVHD wird in zwei Schweregrade eingeteilt: limitiert oder komplex (Tabelle 7).

Tabelle 7: Klassifizierung der chronischen GVHD

Тур	Ausmaß der Erkrankung	
limitiert	Lokalisierte Hautbeteiligung, Leberdysfunktion, oder beides	
komplex	Generalisierte Hautbeteiligung oder Leberdysfunktion plus eins der folgenden Symptome: - Chronische, aggressive Hepatitis (nekrotisch oder zirrhotisch) - Augenbeteiligung - Beteiligung der Speicheldrüsen - Schleimhautbeteiligung - Beteiligung anderer Zielorgane	

Modifiziert nach Shulman et al., 1980 (Shulman et al., 1980)

Klinisch bestehen in den meisten Fällen Hautveränderungen wie Lichen planus, Plaques, Desquamation, Dyspigmentation und Vitiligo. Auch kommen Alopecia und Onychodysplasie vor. Besonders schwere Fälle der chronischen GVHD ähneln der Sklerodermie mit Indurationen, Gelenkkontrakturen, Atrophie und chronischen Hautulcerationen. In 80% liegt eine chronische Cholestase vor, die bis zur Leberzirrhose führen kann. Durch Mukositis des Gastrointestinaltraktes kommt es zu Gewichtsverlust und anderen Störungen. Die chronische GVHD führt auch zu einem Sicca-Syndrom, was durch die Zerstörung der exokinen Drüsen zur Austrocknung und Atrophie dieser Drüsen führt und Auswirkungen auf Haut, Augen, Mund, Ösophagus und Atemwege hat. Sofern das hämatopoetische System im Rahmen einer Thrombozytopenie ebenfalls betroffen ist, stellt dies einen prognostisch ungünstigen Faktor dar.

1.4.5 Prophylaxe und Therapie

Der Gebrauch von immunsuppressiven Medikamenten in der Prophylaxe von akuter GVHD nach Transplantation wird häufig mit einem Regime aus Methotrexat und Cyclosporin durchge-

führt. Die Kombination reduziert die GVHD und steigert die Überlebenschancen. Auch Prednison wird in verschiedenen Kombinationen zur GVHD Prophylaxe angewandt (Chao et al., 2000). Tacrolimus ist ein weiteres potentes Medikament in der Prophylaxe der GVHD und hat sich in Studien dem Cyclosporin in der Prävention als überlegen erwiesen (Ferrara and Deeg, 1991; Nash et al., 2000; Ratanatharathorn et al., 1998).

Für die Behandlung der chronischen GVHD sind Tacrolimus und Thalidomid wirkungsvoll im Einsatz (Parker et al., 1995; Vogelsang et al., 1992; Carnevale-Schianca et al., 2000).

1.5 Das humane Herpesvirus 6 (HHV-6)

Der Erfolg einer KMT wird häufig durch Infektionen (Viren, Bakterien, Pilze) limitiert. Zu den häufigsten Viren, die nach Transplantation auftreten, zählen insbesondere Herpesviren wie das Cytomegalievirus (CMV), das Epstein-Barr-Virus (EBV) und auch HHV-6. Die Primärinfektion mit Herpesviren erfolgt meist im frühen Kindesalter und führt selten zu Komplikationen. Die Viren persistieren jedoch meist lebenslang latent im Organismus und können reaktiviert werden. Dies tritt besonders häufig bei Menschen mit einem defekten Immunsystem auf, z.B. KMT-Patienten (Cone et al., 1999; Maeda et al., 1999; Maltezou et al., 2000).

Das HHV-6 wurde erstmals 1986 aus IL-2 stimulierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*engl.* peripheral blood mononuclear cells, PB-MNC) von Patienten mit AIDS oder lymphoproliferativen Defekten isoliert (Salahuddin et al., 1986). In den PB-MNC Kulturen wurde ein unüblicher zytopathischer Effekt beobachtet, bei dem die Zellen "ballonartig" anschwollen. Das verantwortliche Agens für diese Reaktion wurde elektronenmikroskopisch als Herpesvirus identifiziert. Aufgrund des beobachteten Tropismus wurde das Virus zuerst als Human B-Lymphotropic Virus bezeichnet. Erst später zeigte sich, dass das Virus bevorzugt T-Lymphozyten infiziert und dort auch repliziert. Daraufhin wurde das Virus in Humanes Herpesvirus 6 umbenannt, von dem zwei Varianten bekannt sind: HHV-6A und HHV-6B (Yoshikawa, 2004).

1.5.1 Epidemiologie

Basierend auf seroepidemiologischen Studien ist die Durchseuchung mit HHV-6 sehr hoch. Mindestens 90% der Erwachsenen sind seropositiv für das Virus (Braun et al., 1997; Campadelli-Fiume et al., 1999; Clark, 2000; Ihira et al., 2002). Bei Neugeborenen findet man hohe Titer maternaler, HHV-6 spezifischer Antikörper, welche nach 3-6 Monaten unter die Nachweisbarkeitsgrenze absinken. Wenige Monate später kommt es dann im Laufe der

Primärinfektion zu einem starken Anstieg von anti-HHV-6Antikörpern, welche in den meisten Fällen lebenslang nachweisbar bleiben (Campadelli-Fiume et al., 1999).

Am häufigsten findet die Übertragung durch den Speichel der Mutter auf das Kind statt (Campadelli-Fiume et al., 1999; Harnett et al., 1990). Dabei scheint es sich jedoch ausschließlich um die HHV-6 Variante B zu handeln, da HHV-6A nicht in Speichelproben nachgewiesen werden konnte.

1.5.2 Morphologie

Alle Herpesviren bestehen aus 3 strukturellen Elementen (Abb. 3):

- Einem ikosahedrischen Nukleokapsid mit einem Durchmesser von 90 bis 110 nm, welches das virale DNA-Genom enthält.
- Einer Virushülle, in welcher die Glykoproteine eingebettet sind, welche als antigene Determinante bei der Bildung von Antikörpern gegen HHV-6 eine wichtige Rolle spielen.
- Das Tegument, eine amorphe, globuläre Proteinmatrix, die das Nukleokapsid umgibt und ein Charakteristikum der Herpesviridae ist (Biberfeld et al., 1987; De Bolle et al., 2005).
 Die Funktion des Teguments ist noch nicht vollständig bekannt, vermutlich haben die dort angesiedelten Proteine regulatorische Funktionen (Lopez, 1993).

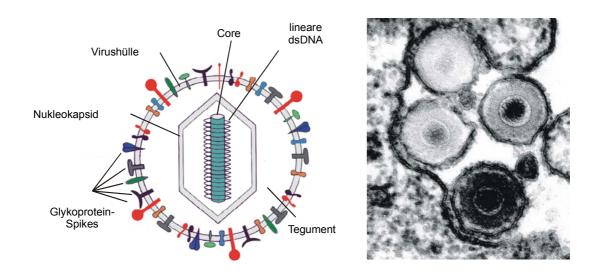


Abbildung 3: Schematische und elektronenmikroskopische Darstellung eines HHV-6A Virions. Die Schematische Abbildung ist modifiziert nach (Modrow and Falke, 1997), die EM-Aufnahme wurde von Dr. S. Biel, Robert Koch-Institut angefertigt.

1.5.3 Morphogenese

Die Infektion der Zielzelle erfolgt durch rezeptorvermittelte Endozytose (Cirone et al., 1992). Sowohl HHV-6A als auch HHV-6B dringen in die Zelle durch Interaktion mit dem CD46-Rezeptor ein (Santoro et al., 1999), welcher auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert wird und in die Komplementregulation involviert ist (Liszewski et al., 1991). Das Nukleokapsid gelangt ins Zytoplasma, wird vom Tegument getrennt und lagert sich an die Mikrotubuli, die es zu den Kernporen transportieren. Anschließend gelangt das Genom durch die Kernporen ins Nukleoplasma. Kapsidproteine bauen sich zu leeren Kapsiden auf und werden mit DNA gefüllt. Die Reifung beginnt mit der Umhüllung des Nukleokapsids. Die umhüllten Nukleokapside knospen unter Verlust der Hülle in spezielle Zytoplasma-Invaginationen in den Kern, wo sie das Tegument erhalten. In cis-Golgi-Zisternen erfolgt die Umhüllung, woraufhin sie sequentiell glykosyliert werden (Cirone et al., 1994; Torrisi et al., 1999). Durch Exozytose werden die reifen Virionen aus der Zellen in den extrazellulären Raum entlassen.

Die Ausbreitung von HHV-6A und HHV-6B in T-Zelllinien variiert beträchtlich (Ablashi et al., 1991). HHV-6A wächst besser in unreifen T-Zelllinien wie CCRF-HSB2-Zellen. Im Gegensatz dazu wächst HHV-6B besser in reifen T-Zelllinien wie MOLT-3-Zellen. In Lymphozyten-kulturen aus humanem Nabelschnurblut wachsen beide Varianten, was durch Stimulation mit Phytohämagglutinin (PHA) und IL-2 noch gesteigert werden kann.

1.5.4 Pathogenese und klinische Manifestation

Die Primärinfektion mit HHV-6 tritt bei Kindern zwischen dem 6. und 12. Lebensmonat auf und ist normalerweise eine akute fiebrige Erkrankung, die 3-5 Tage andauert (Asano et al., 1994). Einige Kinder entwickeln auch die klassische Manifestation des Exanthema subitum (Roseola infantum), die nach der Entfieberung mit einem makulo- bzw. makulopapulösem Ausschlag einhergeht (Abb. 4). In vielen Fällen kann die Primärinfektion aber auch asymptomatisch verlaufen. Erst 1988 wurde die Erkrankung mit der Variante HHV-6B in Verbindung gebracht (Yamanishi et al., 1988). Bisher konnte keine Erkrankung mit einer HHV-6A-Infektion korreliert werden, obwohl im Zusammenhang mit einigen neurologischen Erkrankungen vermehrt HHV-6A DNA nachgewiesen werden konnte (Suga et al., 1993; Wilborn et al., 1994).

Nach einer Primärinfektion mit HHV-6B persistiert das virale Genom in den PB-MNC, möglicherweise in Zellen der myeloischen Reihe. Das Virus scheint auch in den Speicheldrüsen zu persistieren, da routinemäßig virale DNA im Speichel mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) detektiert werden kann (Campadelli-Fiume et al., 1999).

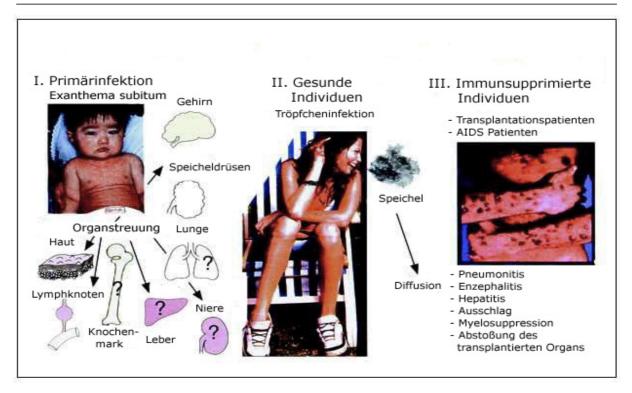


Abbildung 4: Pathogenese von HHV-6 (modifiziert nach Campadelli-Fiume et al., 1999).

1.5.5 HHV-6 und Myelosuppression

Klinische Studien zeigten, dass die idiopathische Myelosuppression bei KMT-Patienten, d.h. nach Ausschluss anderer Gründe für Transplantatversagen einschließlich CMV Infektion, häufiger bei Patienten mit gleichzeitig nachweisbarer HHV-6 Virämie vorkommt, als bei Patienten ohne HHV-6 Virämie (Carrigan and Knox, 1994; Drobyski et al., 1993).

In vivo ließ sich HHV-6 in Vorläuferzellen des Knochenmarks von Patienten mit latenter HHV-6 Infektion nachweisen (Luppi et al., 1999). Boutolleau et al. beschreiben, dass in stammzelltransplantierten Patienten die Viruslast in PB-MNC mit schwerer GVHD und klassischer HHV-6 Manifestationen korreliert (Boutolleau et al., 2003). Weiterhin wurde beobachtet, dass HHV-6 die Bildung und Proliferation von Makrophagen aus Knochenmarkzellen mit GM-CSF und IL-3 nahezu vollständig unterdrückt (Burd et al., 1993).

Die Beobachtung, dass nach Infektion in PB-MNC die Bildung von IFN- α , IFN- β und TNF- α induziert wird, bestätigt die Vorstellung, dass eine Myelosuppression auf direktem Wege über eine von HHV-6 veränderte Zytokin-Sekretion bewirkt wird (Flamand et al., 1991; Kikuta et al., 1990). Radonic et al. beschrieben, dass das Vorhandensein von HHV-6B DNA dem Ausbruch einer GVHD vorangeht und somit zu einer Immunsuppression führt (Radonic et al., 2005).

1.5.6 Virusbiologie

Tabelle 8 fasst die Biologie des HHV-6 noch einmal zusammen.

Tabelle 8: Biologie des humanen Herpesvirus 6 (HHV-6)

Variable	Beschreibung	
Herpesviridae Familie	Subfamilie: Betaherpesvirinae (zusammen mit dem Cytomegalievirus und HHV-7); Genus: Roseolovirus (zusammen mit HHV-7)	
Varianten Genomgröße	HHV-6A und HHV-6B. Die beiden Gruppen unterscheiden sich in ihrem Zelltropismus, ihren Reaktionen mit monoklonalen Antikörpern, Restriktionsmustern sowie ihrer Zytopathogenität und ihren assoziierten Krankheiten. Das virale Genom ist doppelsträngige DNA von ~160,000 bp Länge. Es hat	
-	eine immer gleiche Zentralregion von ~144,000 bp, die an jeder Seite von direct-repeat Elementen variabler Länge flankiert wird.	
Rezeptor	CD46 ist eine notwendige Komponente des Membranrezeptors für HHV-6. Die Rolle von Korezeptoren oder untergeordneten Molekülen ist ungewiss.	
Replikation	In PB-MNC, virale Replikation ist langsam und lytisch	
Übertragung	Es wird vermutet, dass das Virus via oraler Sekretion von Erwachsenen auf Kleinkinder übertragen wird. Auch <i>in utero</i> Übertragung, Blut, Knochenmark oder Transplantate werden diskutiert.	
Zytokine	Die Regulation der Zytokine wird kontrovers diskutiert.	
Tropismus	T lymphotrop. HHV-6 infiziert eine große Anzahl von Zellen in vitro, einschließlich primäre T-Zellen, Monozyten, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen, Astrozyten und Zelllinien T-Zell, B-Zell, glialen und epithelialen Ursprunges.	

modifiziert nach (Braun et al., 1997; Campadelli-Fiume et al., 1999; Caserta et al., 2001; Krueger and Ablashi, 2003; De Bolle et al., 2005)

1.5.7 Antivirale Therapie bei HHV-6

Momentan werden wenige Medikamente für die Prophylaxe und Therapie von HHV-6 eingesetzt. Aciclovir zeigt einen guten Effekt in der Prophylaxe von HHV-6Bei KMT (Rapaport et al., 2002). Gancyclovir verhindert erfolgreich HHV-6 Enzephalitis in Knochenmarktransplantierten (Mookerjee and Vogelsang, 1997). Auch Valacyclovir wird für die Prophylaxe von HHV-6 Reaktivierung empfohlen. Foscarnet und andere Nukleosidanaloga sind in ihrer Wirkung limitiert, da sie keinen Effekt auf die latente Infektion des HHV-6 haben.

1.6 Aufgabenstellung:

Bisher beschriebene Experimente zum Vergleich der Zytokinexpressionsmustern von peripherem Blut und Nabelschnurblut beziehen sich vorwiegend nur auf einzelne Zytokine und beinhalten meist nur eine Methode zur Erfassung der Zytokinexpressionsrate, was der Komplexität der Abläufe und Interaktionen der Zytokine jedoch nicht gerecht wird.

In dieser Arbeit wird ein systematischer Vergleich der Zytokinexpressionsmuster von Nabelschnurblut zu peripherem Blut angestrebt, der Zusammenhänge der Immunantwort durch Darstellung der einzelnen T-Zell-Subgruppen und der für diese spezifischen Zytokine aufzeigt. müssen initial die Subpopulationen der Leukozyten nach verschiedenen Aufbereitungsmethoden differenziert werden. Nach der Identifizierung der relevanten Lymphozytenpopulationen soll der systematische Vergleich der Expression von mRNA einzelner Zytokine sowie deren Proteinniveau im Überstand von Leukozyten aus peripherem Blut (PBL) und Leukozyten aus Nabelschnurblut (CBL) erfolgen. Des Weiteren wird der Einfluss verschiedener Stimuli auf die Zytokine untersucht, um herauszufinden, ob durch Stimulation eine Modulation der Zytokine erfolgt, die sich für eine Immunreaktion interessant darstellen. Darüber hinaus soll der Frage nachgegangen werden, ob zytokinspezifische Transkriptionsfaktoren und deren Expression an der Modulation der Zytokine beteiligt sind und diese mit den entsprechenden Zytokinen korrelieren.

Da eine HHV-6 Infektion als potentieller Risikofaktor nach Transplantation diskutiert wird, soll im zweiten Abschnitt dieser Arbeit untersucht werden, ob eine Infektion mit HHV-6 Einfluss auf die Zytokinproduktion nimmt. Es wurde bereits beschrieben, dass eine Infektion mit Herpesviren mit einer Induktion von Zytokinen einhergeht, was zu der Annahme führt, dass eine Myelosuppression auf direktem Wege über eine von HHV-6 veränderte Zytokin-Sekretion bewirkt werden kann. Daher soll der Einfluss von HHV-6 auf die Zytokinexpression in CBL über einen kürzeren und einen längeren Zeitraum untersucht werden sowie die Veränderungen mit einer zusätzlichen Stimulation.

Abbildung 5 fasst den Versuchsaufbau für die Untersuchungen schematisch zusammen.

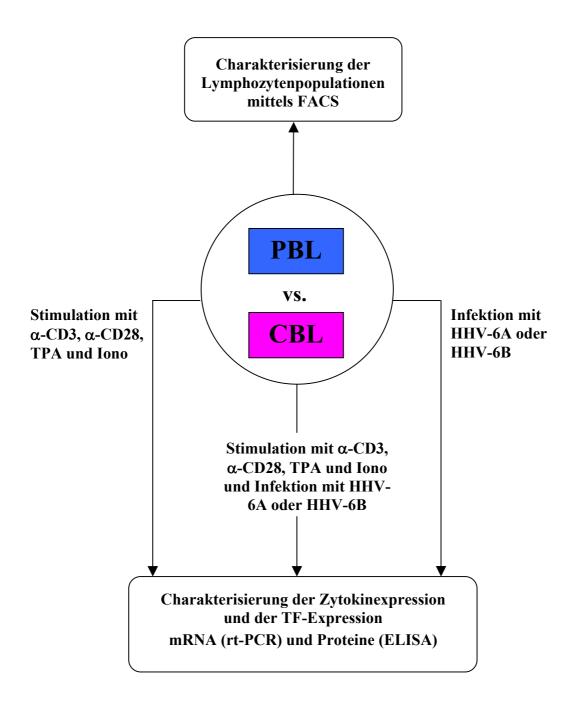


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes.

2. Material und Methoden

2.1 Methoden

Da diese Arbeit im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit dem Institut für klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität Erlangen entstand, wurden die drei unten genannten Methoden dort von PD Dr. Andreas Pahl durchgeführt:

Kapitel 2.1.9 Reverse Transkription und rt-PCR

Kapitel 2.1.11 Bestimmung der DNA Bindungsaktivität von Transkriptionsfaktoren

Kapitel 2.1.12 ELISA

2.1.1 Gewinnung von Nabelschnurblut

Das in dieser Arbeit verwendete Nabelschnurblut (*engl.* Cord Blood, CB) wurde mit freundlicher Unterstützung der Hebammen und Ärzte des St. Joseph Krankenhauses, Berlin-Tempelhof, des DRK-Klinikums Westend, Berlin-Charlottenburg, des DRK-Krankenhauses Köpenick sowie der Charité, Campus Mitte gewonnen. Es wurde ausschließlich Nabelschnurblut von termingerechten Geburten, mit Einverständnis der Mütter, direkt nach der Geburt durch Punktion der Nabelvene in sterile Heparinröhrchen entnommen und bei 4°C gelagert. Für die Durchführung der Versuche durfte das Nabelschnurblut nicht älter als 24 Stunden sein.

2.1.2 Isolierung von Nabelschnurblutleukozyten

Die Gewinnung von Nabelschnurblutleukozyten (*engl.* Cord Blood Mononuclear Cells, CB-MNC) erfolgte mittels Ficoll-Dichtegrad-Zentrifugation, welche nach Standardprotokollen durchgeführt wurde. Dazu wurde das CB aus den Heparinröhrchen entnommen und in eine sterile Zellkulturflasche überführt, in der das CB mit Ficoll-Puffer im Verhältnis 1:4 verdünnt wurde. In einem 50 ml-Falcon-Röhrchen wurden 15 ml Ficoll mit 35 ml Blut-Ficoll-Puffer-Suspension überschichtet und bei 400 x g ohne Bremse 30 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Nach Zentrifugation zeigte sich eine Vierschichtung, bei der die oberste Schicht mit Ficoll-Puffer verdünntes Plasma darstellt, gefolgt von einer Interphase, die aus mononukleären Zellen besteht, darunter liegt eine Ficoll-Schicht und zu unterst der Bodensatz mit Blutzellen, in dem sich Erythrozyten, Granulozyten und andere Zellen befinden.

Nach der Entnahme der oberen Plasmaschicht, wurden die mononukleären Zellen mit Hilfe einer Pasteurpipette isoliert und sie wurden in ein neues 50 ml-Falconröhrchen überführt, in welchem

die Zellen zweimal mit 50 ml Ficoll-Puffer für 10 min in der Zentrifuge bei RT und 400 x g gewaschen wurden. Das Zellpellet wurde zum Zählen in 1 ml Medium/Puffer resuspendiert.

2.1.3 Gewinnung von peripherem Blut

Das periphere Blut (*engl.* Peripheral Blood, PB) wurde von freiwilligen gesunden Spendern durch Punktion der Vena mediana cubiti in sterile Heparinröhrchen gewonnen und bei 4°C gelagert. Für die Durchführung der Versuche durfte das periphere Blut ebenfalls nicht älter als 24 Stunden sein. Die Isolierung der mononukleären Zellen aus PBL erfolgte analog zur Isolierung von Nabelschnurblutleukozyten (Kapitel 2.1.2.).

2.1.4 Zellzählung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Färbung der Zellen entweder mit Türk'scher Lösung oder mit Trypanblau. Die Färbung mit Türk'scher Lösung führt zu einer Erythrozyten-Lyse, wonach bei der Zellzählung keine verbliebenen Erythrozyten den Zählwert verfälschen können. Die Trypanblau-Färbung färbt hingegen tote Zellen blau, so dass bei Bedarf nur lebendige Zellen gezählt werden können.

Es wurden 10 μl Zellsuspension mit 90 μl Türk'scher Lösung bzw. Trypanblau aufgefüllt und gemischt, um 10 μl von diesem Gemisch in eine Neubauer Zählkammer zu geben. Die ermittelte Zellzahl ergab sich durch Mittelung der Auszählung von 4 Quadranten a 16 Feldern.

2.1.5 Zell- und Viruskultur

Die in dieser Arbeit verwendeten primären Zellkulturen umfassten die Stimulation von CB-MNC zum Zweck der HHV-6Anzucht.

2.1.5.1 Stimulation mononukleärer Zellen aus Nabelschnurblut

HHV-6 infiziert vorwiegend proliferierende Lymphozyten. Deshalb können nach 24-48 Stunden mitogener Stimulation von CBL höhere Virustiter in der Kultur erreicht werden. Zu diesem Zweck wurden frisch präparierte CBL in einer Konzentration von 1 x 10⁶/ml in RPMI 1640 mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin, 10 μg/ml Streptomycin und 200 mM Glutamax I aufgenommen. Zur Stimulation wurden dem Medium 10 U/ml humanes Interleukin-2 (rhIL-2) und 5 μg/mL PHA zugesetzt und die Zellen bei Standardbedingungen (37°C und 5% CO₂ in einem Feuchtbrutschrank) inkubiert.

2.1.5.2 Stimulation (mitogen und Oberflächenrezeptor) mononukleärer Zellen aus Nabelschnurblut und peripherem Blut

Für die Stimulationsversuche erfolgte die Inkubation von 1 x 10^6 Zellen/ml in o.g. Medium sowie α -CD3 mAb (1 μ g/ml), α -CD28 mAb (0,3 μ g/ml), TPA (25ng/ml), Ionomycin (1 μ M) oder Kombinationen der Stimuli. Für die mRNA-Messung mittels Echt-Zeit-Polymerasekettenreaktion (rt-PCR) wurde für 4 Stunden unter Standardbedingungen stimuliert. Die Bestimmung der Proteine im Überstand mittels ELISA erfolgte nach 24 Stunden Stimulation unter Standardbedingungen.

2.1.5.3 Kultivierung von HHV-6

In dieser Arbeit wurde mit dem HHV-6A Stamm U1102 und dem HHV-6B Stamm R104 gearbeitet. Die Stämme wurden uns von Dr. Frank Neipel aus der Arbeitsgruppe von Prof. B. Fleckenstein, Institut für Virologie - Erlangen, zur Verfügung gestellt. Des Weiteren wurde mit dem HHV-6B Stamm Z29 von Advanced Biotechnology gearbeitet.

Während HHV-6A Stämme gut auf T-Zelllinien vermehrt werden können, verwendet man für HHV-6B frisch stimulierte Lymphozytenkulturen. Die Infektionsprotokolle für beide Varianten sind dabei identisch. Die Kultivierung erfolgte dann ebenfalls wie die Zellkultur der Nabelschnurblutlymphozyten unter Standardbedingungen.

2.1.5.4 Infektion von Zelle zu Zelle

Die zu infizierenden Zellen wurden in einem Volumen von 1-2 ml RPMI 1640 mit infizierten Zellen im Verhältnis 5:1 gemischt und 2 h unter Standardbedingungen inkubiert. Alternativ konnten die Zellen bei 37°C und 400 x g für 40 min zentrifugiert werden, wodurch die Infektion effizienter wurde. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml RPMI 1640 mit 10% FKS, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin resuspendiert und unter Standardbedingungen kultiviert. Alle 3-4 Tage wurde das Medium zu etwa einer Hälfte ausgetauscht.

2.1.5.5 Infektion mit zellfreien Kulturüberständen

Sollte im Rahmen eines Versuches eine neue Zellreihe infiziert werden, ohne dass bereits infizierte Zellen in die neue Kultur gelangen, resuspendierte man die zu infizierenden Zellen in zellfreiem Kulturüberstand stark infizierter Zellkulturen (ca. 80% infiziert). Richtlinie für eine effiziente Infektion war die Suspension von 1 x 10⁶ Zellen in 1 ml Kulturüberstand. Auf diese Weise infizierte Zellen erreichten erst später vergleichbare Infektionsgrade als bei der Zell-zu-Zell-Infektion, abhängig vom Virustiter des zur Infektion verwendeten Kulturüberstandes.

2.1.6 Immunfluoreszenz-Assay (IFA) und Bestimmung des Anteils infizierter Zellen

Mit dem IFA werden mittels spezifischer Antikörper und mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Spezies-spezifischen Sekundär-Antikörpers infizierte Zellen detektiert. 1 x 10⁵ der zu untersuchenden Zellen wurden auf einen Objektträger mit 10-Loch Teflonmaske aufgetropft, welcher zuvor zur Entfettung abgeflammt wurde. Nach dem Auftropfen der Zellen auf den Objektträger folgte das Trocknen bei 37°C. Die Zellen ließen sich durch Auftropfen von 10 μl eiskaltem Aceton oder alternativ 10 μl 0,1%igem Formaldehyd in PBS (Phosphate buffered saline, *engl.* Phosphat gepufferte Salzlösung) fixieren, gefolgt von 10-15 min Inkubation. Anschließend inkubierte man 30 min in einer feuchten Kammer bei 37°C in Dunkelheit mit 10 μl des mAb H-AR-2 (1:100 verdünnt mit PBS) und wusch dann 3 x 5 min in PBS und 1 x 1 min in Aqua dest. Im nächsten Schritt erfolgte die Trocknung des Präparates durch vorsichtiges Fönen. Danach wurden 10 μl des Fluoreszenzmarkierten Sekundär-Antikörpers aufgetropft (1:100 verdünnt mit 0,04%igem EVANS-Blue) und ebenfalls 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer bei Dunkelheit inkubiert. Das Präparat wurde wie oben beschrieben gewaschen, mit Anti-fade Medium eingedeckelt und bis zur Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 4°C bei Dunkelheit aufbewahrt.

Die Bestimmung infizierter Zellen erfolgte mikroskopisch mittels Auszählung von 200 Zellen pro Präparat, um den prozentualen Anteil infizierter Zellen zu berechnen.

2.1.7 Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS)

2.1.7.1 Immunfluoreszenzmarkierung von Leukozyten

Für die Durchflusszytometrie wurden 2-5 x 10⁵ Zellen pro Ansatz benötigt. In FACS-Röhrchen wurden die für die Messung benötigten Antikörper (Menge nach Herstellerangaben) vorgelegt, wobei in ein Röhrchen jeweils 2-3 Antikörper vorgelegt wurden, die jeweils mit verschiedenen Fluorochromen markiert sind (Tabelle 9). Es folgte eine Inkubation der Zellen mit den Antikörpern für 10 min bei Dunkelheit und RT. Die Proben wurden in 3-4 ml FACS-Spülpuffer gewaschen und bei 400 x g 5 min zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 250 μl FACS-Puffer pro Ansatz aufgenommen, um sie zu messen. Die in dieser Arbeit gemessenen Antikörper sind in Tabelle 11 des Materialteiles beschrieben.

2.1.7.2 Immunfluoreszenzmarkierung von Leukozyten in Vollblut

Die Immunfluoreszenzmarkierung von Leukozyten in Vollblut erfolgte analog zum Versuchsablauf von Leukozyten aus MNC. Nach Inkubation mit den Antikörpern und Waschen erfolgte eine Erythrozytenlyse mit je 1 ml FACS Lysing Solution für 10 min. Es folgte einer erneuter Waschvorgang in 3-4 ml FACS-Spülpuffer bei 400 x g für 5 min. Danach wurden die Zellen in für die Messung in 250 µl FACS-Puffer pro Ansatz aufgenommen.

2.1.7.3 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein optisches Verfahren, das die rasche Bestimmung zellspezifischer Parameter erlaubt. Dabei wird in einem hydrodynamischen System ein Flüssigkeitsstrom erzeugt, der die zuvor mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbten Zellen separat an einem Beobachtungspunkt vorbeiführt. Am Beobachtungspunkt wird durch Laser erzeugtes Licht eingekoppelt und, basierend auf Lichtstreueffekten und Fluoreszenz, werden die spezifischen Messgrößen der einzelnen Zellen erfasst. Man erhält die Verteilung der Messgröße über die Zellpopulation (Degelau 1993).

Die Streulichtparameter enthalten ein Vorwärtsstreulicht (*engl*. Forward Scatter, FSC), welches die Zellpopulationen aufgrund ihrer Größe definiert, und ein Seitwärtsstreulicht (*engl*. Sideward Scatter, SSC), welches ein relatives Maß für die intrazelluläre Granulation der Zellen darstellt. Durch weitere fluoreszenzabhängige Parameter können Oberflächenantigene sichtbar gemacht werden (Abb. 6). Dabei wird die Fuoreszenzintensität von Fluoreszeinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und Peridin Chlorophyll Protein (PerCP) durch unterschiedliche Wellenlängen des emittierten Lichtes unterschieden. Die Quantifizierung der Fluoreszenz- und Streulichtemissionen wurden gespeichert und mit Hilfe der Computerprogramme CellQuest und CellQuest Pro ausgewertet.

Tabelle 9: Absorptions- und Emissionsmaxima von den in der Durchflusszytometrie eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffen

Fluorochrom	Absoptionsmaxima [nm]	Emissionsmaxima [nm]
FITC	495	519
PE	480; 565	578
PerCP	490	675

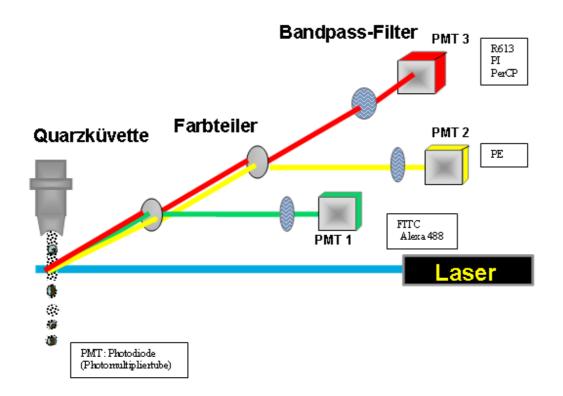


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Strahlenganges eines FACScan-Gerätes (http://www.toxikologie.uni-mainz.de/facslab/zytometrie.jsp)

2.1.8 Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA aus Kulturzellen erfolgte mit dem QIAamp RNA Blood Mini Kit von Qiagen. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Um DNA-freie RNA zu erhalten wurde zusätzlich ein DNA-Verdau mit dem dafür vorgesehenen RNeasy Mini Kit von Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt. Bis zur Verwendung wurde die RNA nach Elution in RNAse freiem Wasser bei –80°C eingefroren.

2.1.9 Reverse Transkription und rt-PCR

Die reverse Transkription gefolgt von der Polymerase Kettenreaktion ist die sensitivste Methode, um geringe Mengen an mRNA nachzuweisen. Dazu wurde die RNA mit Hilfe des RNeasy Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerinformationen aus gefrorenen Zelllysaten isoliert. Um etwaige DNA Verunreinigungen zu entfernen, wurde die DNA mittels des RNase-Free DNase Sets (Qiagen, Hilden) nach Herstellerinformationen verdaut. Die reverse Transkription und die Echt-Zeit (*engl.* real-time) rt-PCR wurden unter Benutzung des QuantiTect Probe rt-PCR Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerinformationen an einem ABI Prism 7900 durchgeführt. Die reverse Transkription erfolgte für 30 min bei 50°C, bevor sich zur Denaturierung der

Ribonukleinsäuren eine Inkubation für 15 min bei 95°C anschloss. Für die Amplifizierung der cDNA folgten 45 Zyklen bestehend aus Denaturierung für 30 sec bei 94°C und Primeranlagerung und Replikation für 1 min bei 60°C.

Bei der rt-PCR wird die Akkumulation des PCR Produktes im Verlauf der PCR Reaktion zu jeder Zeit gemessen. Damit kann eine Quantifizierung für jede einzelne Probe individuell in der exponentiellen Phase der Amplifikation stattfinden. Im Gegensatz zu Echt-Zeit PCR Tests, wird bei konventionellen quantitativen PCR Methoden nach einer definierten Anzahl von Zyklen analysiert, wobei man keine Auskunft darüber hat, ob sich die PCR bereits in der Plateau-Phase befindet. Dort besteht keine Abhängigkeit mehr zwischen der Signalstärke und der eingesetzten Menge an mRNA-Matrize. Zur Zeit sind unterschiedliche Formate der Echt-Zeit PCR bekannt. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Format handelt es sich um das Exonuklease-Format (Abbildung 7). Zusätzlich zu den Primern befindet sich im Reaktionsgemisch die Signal-gebende Exonuklease-Sonde. Diese wird so ausgewählt, dass sie schon bei höheren Temperaturen als die Primer, aber ebenfalls spezifisch, mit dem Amplikon hybridisiert.

Es erfolgt eine Markierung am 5'-Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff. Durch Phosphorylierung am 3'-Ende ist sie nicht verlängerbar und kann nicht als Primer dienen. Bei Anregung der intakten Sonde durch einen Laser wird die entstehende Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs durch die räumliche Nähe des Quencher-Farbstoffs unterdrückt. In der Elongationsphase der PCR Reaktion wird nun die hybridisierte Exonuklease-Sonde durch die 5'3'-Exonuklease Aktivität der Tag DNA

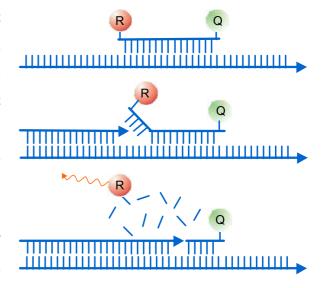


Abbildung 7: Prinzip der TaqMan Reaktion

Polymerase degradiert und dadurch die für das Quenching erforderliche räumliche Nähe zwischen Reporter-Farbstoff und Quencher aufgehoben. So entsteht während der Elongation ein Fluoreszenzsignal, welches zu jedem Zeitpunkt proportional zur Menge des PCR Produktes ist. Die kontinuierliche Messung dieses Fluoreszenzsignals erlaubt so die Echt-Zeit Überwachung der PCR Reaktion.

Zur Quantifizierung wird für jede Probe bestimmt, bei welchem Zyklus ein definierter Anstieg der Fluoreszenz in der exponentiellen Phase erreicht wird und als C_T, (*engl.* threshold cycle,

Schwellenwert) bezeichnet. Bei diesem Zyklus überschreitet die Fluoreszenz in jeder Probe das 10-fache der Standardabweichung der Zyklen 3-15. Das Niveau der mRNA der Zytokine wurde auf das Housekeeping Gen β -Actin normalisiert nach folgender Formel: $\Delta C_T = C_T^{\beta$ -actin - $C_T^{zytokine}$. Die Ergebnisse sind als $2^{\Delta CT}$ dargestellt, basierend auf Ergebnissen von Kontroll-Exprimenten mit einer angenommenen Effizienz der PCR Reaktion von nahezu 100%. Die gemessenen Gene sind im Materialteil angegeben (Kapitel 2.2.4).

2.1.10 Kern- und Zytosolextraktion

Die Kern- und Zytosolextraktion erfolgte nach einem Protokoll der Firma Clontech. Die zu präparierenden Zellen, in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen periphere und Nabelschnurblutleukozyten, wurden 5 min bei 4°C bei 450 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Danach wurden die Zellen durch zweimalige Zentrifugation mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Da die Puffer in Volumenteilen (VT) zugegeben werden, muss die Menge des Zellpellets geschätzt werden. Die Zellen wurden in 5 VT Lysis Puffer aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Diese Suspension wurde 15 min auf Eis inkubiert und danach 5 min bei 420 x g bei 4°C zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes, wurde das Zellpellet in zwei VT Lysis Puffer, der die Auflösung der Zellmembran bewirken soll, aufgenommen. Nun folgte die Zerstörung der Zellen durch Scherkräfte mittels einer Spritze mit einer sehr feinen Kanüle, die vorher mit Lysis Puffer gespült wurde. Nach 10 Hüben wurde die Suspension bei 10.000 x g 20 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand stellt die zytosolische Fraktion dar und wird bei -80°C eingefroren. Zum Kernpellet wurden nun 2/3 VT des Extract-Puffers gegeben und das Prozedere mit der Spritze wie vorher wiederholt, um die Kerne zu zerstören. Die Suspension wurde 30 min bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert und danach 5 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Der Überstand stellt das Kernextrakt dar, in dem nun die Proteinkonzentration gemessen wurde. Die Extrakte wurden bei -80°C eingefroren.

2.1.11 Bestimmung der DNA Bindungsaktivität von Transkriptionsfaktoren

Die DNA Bindungsaktivität von Transkriptionsfaktoren wurde mit dem Transfactor System von Clontech (Heidelberg, Deutschland) bestimmt. Die Kernextrakte wurden nach oben genanntem Protokoll (Kapitel 2.1.10) nach einstündiger Stimulation präpariert.

Das Prinzip funktioniert nach folgendem Schema: Der Kit enthält 96-well Platten mit Oligonucleotiden, die eine entsprechende DNA-bindende Sequenz für einen Transkriptionsfaktor beinhalten. Bei Inkubation des Zellextraktes mit diesen entsteht eine Bindung. Gebundene Transkriptionsfaktoren werden durch einen spezifischen Primärantikörper detektiert. Bei Zugabe

von Meerettich-Peroxidase entsteht ein enzymatisches Produkt, welches mittels kolorimetrischer

Detektion oder einem Luminometer für Chemoluminiszenz gemessen wird.

2.1.12 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

MNCs von Nabelschnurblut und peripherem Blut wurden mit und ohne Stimuli unter Standardbedingungen für 24 Stunden inkubiert. Der Überstand wurde bei –80°C eingefroren und der ELISA nach dem Protokoll von Pharmingen mit den entsprechenden ELISA-Kits von Pharmingen durchgeführt.

Bei diesem immunologischen Nachweisverfahren wird eine Unterlage mit Antikörpern (capture antibody) beschichtet, welche das zu bestimmende Antigen zu binden vermögen. An diesen Antikörper-Antigen Komplex bindet sich nun ein zweiter, enzymgekoppelter Antikörper (detection antibody) an das Antigen. Das Enzym ist nun in der Lage, ein farbloses Substrat in ein farbiges Produkt oder ein nichtfluoreszierendes Substrat in ein intensiv fluoreszierendes Substrat umzuwandeln. Die Bindung des zweiten Antikörpers ist proportional zur Menge des Antigens in der Probe, so dass man durch die Messung des Farb- bzw. Fluoreszenzumsatzes die Menge des zu analysierenden Antigens bestimmen kann.

2.1.13 Statistische Analyse

Die Daten wurden dargestellt als Median \pm dem Standardfehler des Medians. Signifikante Unterschiede wurden statistisch mit dem ungepaarten Student t-Test ausgewertet. Die IC₅₀ Werte wurden mit Hilfe des Computerprogrammes PRISM 3.0 berechnet (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, U.S.A).

2.2 Material und Chemikalien

2.2.1 Puffer

PBS (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)	
10x PBS (Gibco, Rockville, USA)	100,0 ml
Aqua bidest.	ad 1000,0 ml
Ficoll-Puffer	
EDTA (Merck, Darmstadt, Germany)	2,0 mM
1x PBS pH 7,2	ad 1000,0 ml
FACS-Waschpuffer	
NaN_3	2,0 g
Glucose	18,0 g
1x PBS pH 7,2	ad 1000,0 ml
FACS-Puffer	
NaN_3	2,0 g
Glucose	18,0 g
FKS	5,0 ml
1x PBS pH 7,2	ad 1000,0 ml
Pre-Lysis Puffer	
HEPES pH 7,9	10 mM
$MgCl_2$	1,5 mM
KCl	10 mM
Lysis Puffer	
Pre-Lysis Puffer	1,47 ml
DTT 0,1 M (Gibco, Rockville, USA)	15 μl
Protease inhibitor cocktail (Sigma, St. Louis, USA)	15 μl

Material und Methoden

Due Erstue of	DCC
Pre-Extract	Puffer

HEPES pH 7,9	20 mM
$MgCl_2$	1,5 mM
NaCl	0,42 M
EDTA	0,2 mM
Glycerol	25% (v/v)

Extract Puffer

Pre-Extract Puffer	147 µl
DTT 0,1 M	1,5 μl
Protease inhibitor cocktail	1,5 µl

2.2.2 Zellzucht und IFA

IMDM Iscove's Modified Dulbecco's Medium mit L-

Glutamin ohne weitere Zusätze, Gibco, Rockville

RPMI 1640 RPMI 1640 mit Glutamax, Gibco, Rockville, USA

FKS GIBCO, Rockville 10,0% (v/v)

Penicillin100,0 U/mLStreptomycin100,0 µg/mL

Glutamax I GIBCO, Rockville 200,0 mM

Ficoll Ficoll Separating Solution, Isotonisch, Dichte 1,077,

Biochrom KG, Berlin, Germany

Sterile Einwegartikel Falcon BD, Franklin Lakes, USA

Trypanblau Sigma, St. Louis, USA

Türk'sche Lösung Merck, Darmstadt, Germany

mAb H-AR-2 Prof. Luka, biotinyliert bei BioGenes, Berlin

EVANS Blue Sigma, St. Louis, USA

Tabelle 10: Substanzen für die Stimulation der CB-MNC

Substanz Abkürzung	Substanz Name	Verdünnung	Hersteller
IL-2	Humanes IL-2	10 Units/ml	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
РНА	Phytohämagglutinin	5 μg/ml	Sigma, St. Louis, USA
CD3	Clone: UCHT1	1 μg/ml	BD PharMingen, San Diego, USA
CD28	Clone: CD28.2	0,3 μg/ml	BD PharMingen, San Diego, USA
PMA=TPA	Phorbol 12-Myristate 13- Acetate	25 ng/ml	Sigma, St. Louis, USA
Ionomycin	Ionomycin Calcium Salt	1 μΜ	Sigma, St. Louis, USA

2.2.3 Durchflusszytometrie

FACS-Geräte
FACSScan, Becton Dickinson, San Jose, USA
FACS-Flow
Becton Dickinson, San Jose, USA
FACS-Safe
Becton Dickinson, San Jose, USA
FACS-Rinse
Becton Dickinson, San Jose, USA
FACS-Rinse
Becton Dickinson, San Jose, USA
FACS Lysing Solution
Becton Dickinson, San Jose, USA

Tabelle 11: FACS-Antikörper

Zellmarker	Clone	Isotyp	Farbstoff	Hersteller
CD28	CD28.2	Maus, IgG1	FITC	Coulter Immunotech, Marseille, Frankreich
CD45Ro	UCHL1	Maus IgG2a	FITC	Coulter Immunotech, Marseille, Frankreich
CD3	UCHT1	Maus, IgG1	PE	Coulter Immunotech, Marseille, Frankreich
CD4	UCHT1	Maus, IgG1	PE	Coulter Immunotech, Marseille, Frankreich
CD45Ra/CD4	CD45Ra: ALB11 CD4: 13B8.2.	Maus, IgG1	CD45Ra: FITC CD4: PE	Coulter Immunotech, Marseille, Frankreich
CD45	2D1	Maus IgG1, kappa	PerCP	Becton Dickinson, San Jose, USA

2.2.4 rt- PCR und ELISA

QuantiTect Probe rt-PCR KitQiagen, HildenRNeasy Mini KitQiagen, HildenQIAamp RNA Blood Mini KitQiagen, HildenRNase-Free DNase SetQiagen, Hilden

Gerät: ABI Prism 7900

Primer und Probes

	Actin	Orientierung	Acc.No.
F	CAGCGGAACCGCTACTTGCCAATGG	A	NM_001101.2
R	TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA	S	NM_001101.2
TM	ATGCCCTCCCCATGCCATCCTGCGT	S	NM_001101.2

	IL-2	Orientierung	Acc.No.
F	GAATGGAATTAATAATTACAAGAATCCC	S	NM_000586.3
R	TGTTTCAGATCCCTTTAGTTCCAG	A	NM_000586.3
TM	ATGCCCAAGAAGGCCACAGAACTG	S	NM_000586.3

	IL-3	Orientierung	Acc.No.
F	GCTCCCATGACCCAGACAAC	S	NM_000588.3
R	GGCAGACATGGCAGGAGATT	A	NM_000588.3
TM	AGCTGGGTTAACTGCTCTAACATGATCGATGAAA	S	NM_000588.3

	IL-4	Orientierung	Acc.No.
F	CCCCCTCTGTTCTTCCTGCT	S	NM_000589.2
R	AGCCCTGCAGAAGGTTTCCT	A	NM_000589.2
TM	TGCCGGCAACTTTGTCCACGG	S	NM_000589.2

	IL-5	Orientierung	Acc.No.
F	AGGATGCTTCTGCATTTGA	S	NM_000879.2
R	TTCTATTATCCACTCGGTGTTC	A	NM_000879.2
TM	TATGCCATCCCCACAGAAATTCCCACA	S	NM_000879.2

Material und Methoden

	IL-10	Orientierung	Acc.No.
F	AGGCTACGGCGCTGTCATC	S	NM_000572.2
R	GGCATTCTTCACCTGCTCCA	A	NM_000572.2
TM	CTTCCCTGTGAAAACAAGAGCAAGGCC	S	NM_000572.2

	IL-13	Orientierung	Acc.No.
F	GGAGCTGGTCAACATCACCC	S	NM_002188.2
R	CGTTGATCAGGGATTCCAGG	A	NM_002188.2
TM	CCAGAAGGCTCCGCTCTGCAATGGC	S	NM_002188.2

	IFN-γ	Orientierung	Acc.No.
F	CGAGATGACTTCGAAAAGCTGAC	S	NM_000619.2
R	CGCTTCCCTGTTTTAGCTGC	A	NM_000619.2
TM	TCCAAGTGATGGCTGAACTGTCGCC	S	NM_000619.2

	GM-CSF	Orientierung	Acc.No.
F	GCCCTGGGAGCATGTGAAT	S	NM_000758.2
R	GCTCCAGGCGGGTCTGTAG	A	NM_000758.2
TM	AGGCCCGGCGTCTCCTGAACCT	S	NM_000758.2

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit werden Unterschiede zwischen CBL und PBL bezüglich verschiedener Kriterien herausgearbeitet: Dabei wird das Vorkommen einzelner Lymphozytenpopulationen, die Zytokin-produktion, charakteristische Transkriptionsfaktoren und das Verhalten gegenüber einer Infektion mit HHV-6 untersucht.

Bei dem systematischen Vergleich von CBL und PBL erfolgte initial die Charakterisierung einzelner Lymphozytenpopulationen mittels Durchflusszytometrie. Im Anschluss daran wurde die Zytokin-Genexpression und der Zytokingehalt mittels rt-PCR und ELISA bestimmt, ebenso wie die Expression von relevanten Transkriptionsfaktoren.

Der zweite Teil geht auf den Einfluss von HHV-6 auf die Zytokinexpression ein, wobei die zuvor erwähnten Methoden verwendet wurden.

3.1 Vergleich Nabelschnurblut vs. peripheres Blut

3.1.1 Analyse der Lymphozytenpopulationen in peripherem Blut und Nabelschnurblut

Zur Analyse der verschiedenen Lymphozytenpopulationen in PB und CB, wurden Messungen mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Dies erfolgte anhand definierter Oberflächenmarker (CD3, CD4, CD28, CD45Ro, CD45Ra), die für einzelne Lymphozytenpopulationen charakteristisch sind. Zur Separierung von MNC kam zur weiteren Bearbeitung des jeweiligen Blutes die Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation (Ficoll) zum Einsatz (Kapitel 2.1.2). Gemessen wurden jeweils 10.000 Zellen.

Im ersten Schritt sollten Lymphozyten betrachtet werden, weshalb diejenigen Zellen einzugrenzen waren, die sowohl eine geringe Größe als auch eine niedrige Granularität aufwiesen. Die Darstellung erfolgte anhand von FSC, was sich proportional zur Zelloberfläche bzw. Zellgröße verhält und SSC, was sich proportional zur Zellkomplexität bzw. -granularität verhält. In einem weiteren Ansatz wurden Zellen eingegrenzt, die in Größe und Granularität Lymphozyten entsprechen und den Oberflächenrezeptor CD45 tragen, der als Pan-Lymphozytenmarker fungiert.

Bei der Auswertung der FACS-Daten wurden ausschließlich die Lymphozyten betrachtet. Alle weiteren Daten der Oberflächenmarker sind auf die eingegrenzten Lymphozyten bezogen.

Abbildung 8 zeigt Ergebnisse von FACS-Messungen nach der Separierung von CB-MNC durch Aufbereitung mit Ficoll.

In Abbildung 8A sind Lymphozyten (R2) nach den Kriterien von Größe und Granularität eingegrenzt. In R2 befinden sich 4.644 von 10.000 Zellen, d.h. 46,44%. In Abbildung 8B wird CD45 PerCP gegen SSC gezeigt, bei der die CD45⁺ Zellen eingegrenzt sind (R1). In R1 befinden sich 2.240 von 10.000 Zellen, d.h. 22,4%.

Abbildung 8C und 8D zeigen, dass sich in einem nach Lymphozyten spezifischer Größe und Granularität gelegten Eingrenzung Zellen befinden, die zwar in Größe und Granularität Lymphozyten entsprechen, jedoch nicht den Oberflächenmarker CD45 tragen.

Abbildung 8D zeigt alle Zellen, die zuvor in der nach Größe und Granularität eingegrenzten Lymphozytenpopulation liegen und zusätzlich mit einer dritten Fluoreszenz (CD45 PerCP) gefärbt sind. Hierbei sieht man, dass es einen großen Anteil an Zellen gibt, die den CD45 Oberflächenmarker nicht tragen, sich aber trotzdem in der Lymphozytenpopulation befinden. Die Zellen in R1 befinden sich in den eingegrenzten Lymphozyten und weisen zusätzlich den Oberflächenmarker CD45 auf.

Drückt man dies in Zahlen aus, ergibt sich, dass in dem nach Größe und Granularität eingegrenzten Bereich der Lymphozyten (Abb. 8A,R2) ein prozentualer Anteil von 46,44% der Gesamtzellzahl liegt. Betrachtet man zusätzlich die CD45 positiven Zellen, liegen nur noch 22,4% der Zellen in diesem Bereich (Abb. 8D, R1). Damit sind nur 47,16% der Zellen aus Abb. 8A CD45 positiv.

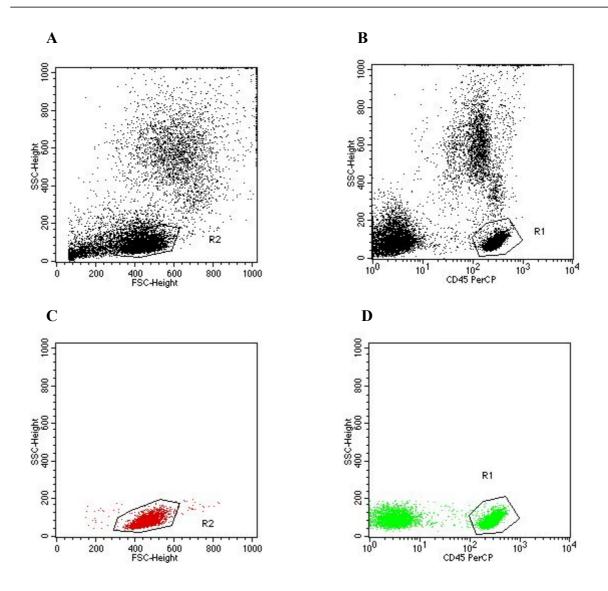


Abbildung 8: FACS-Analyse der Lymphozyten und zusätzliche Färbung mit CD45. Mit Ficoll aufbereitetes CB. A,C: Nach Lymphozyten spezifischer Größe und Granularität eingegrenzter Lymphozytenbereich; B,D: Lymphozyteneingrenzung mit zusätzlicher Bestimmung des Pan-Leukozytenmarkers (CD45) positiven Zellen.

Durch Verknüpfung der o.g. eingegrenzten Bereiche, kann man alle Zellen darstellen, die sich in der Lymphozytenpopulation befinden und den Oberflächenrezeptor CD45 tragen.

In Abbildung 9 sind exemplarisch zwei Oberflächenmarker dargestellt, die in dieser Arbeit untersucht werden. Zum einen CD45Ra, der sich auf naiven T-Zellen findet und CD4, der auf T-Zellen exprimiert wird.

In Abb. 9A werden im rechten unteren Quadranten die Zellen dargestellt, die sowohl in der eingegrenzten Lymphozytenpopulation wiederzufinden sind als auch im Bereich der CD45 positiven Zellen (R1 und R2) und den Oberflächenmarker CD45Ra tragen. Anhand absoluter

Zahlen zeigt sich, dass hier 2144 Zellen liegen, was 97,9% der Zellen entspricht, die sowohl in der Lymphozytenpopulation liegen als auch CD45 positiv sind.

Im Gegensatz dazu zeigt Abb. 9B Zellen, die sich in der Lymphozytenpopulation befinden, aber nicht zwangsweise CD45 positiv sind. Hierbei sieht man, dass sich im linken unteren Quadranten noch eine Vielzahl an Zellen befindet, die nicht den Oberflächenmarker CD45Ra tragen. Vergleicht man nun diese zwei Abbildungen wird deutlich, dass die Lymphozytenpopulation noch andere Zellpopulationen einschließt, die nicht CD45 positiv sind. Analog hierzu sieht man auch den erheblichen Unterschied bei der Darstellung des Oberflächenmarkers CD4 in Abb. 9C und D.

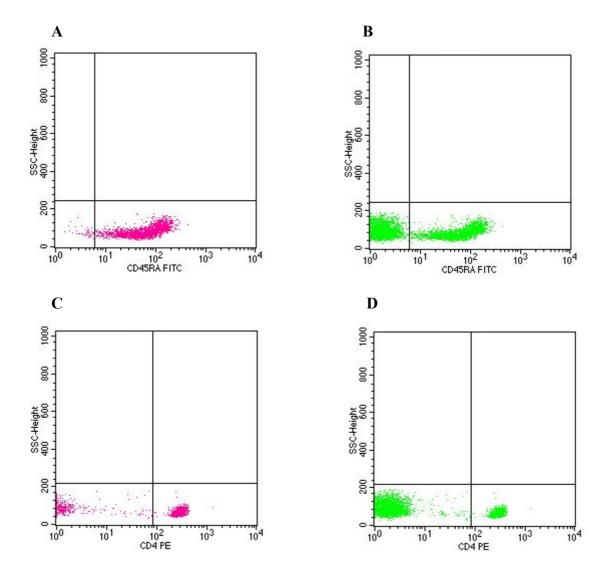


Abbildung 9: FACS-Analyse von CD45Ra und CD4 und zusätzliche Färbung mit CD45. Mit Ficoll aufbereitetes CB. A,C: CD45Ra bzw. CD4 Bestimmung bei zuvor nach Lymphozyten spezifischer Größe und Granularität gelegtem Lymphozytenbereich. B,D: CD45Ra bzw. CD4 Bestimmung bei zusätzlicher Bestimmung CD45 positiver Zellen.

Abbildung 10 zeigt exemplarisch die FACS Analyse von PBL und CBL, jeweils Messungen von Vollblut nach Erylyse und mit Ficoll aufbereitetem Blut.

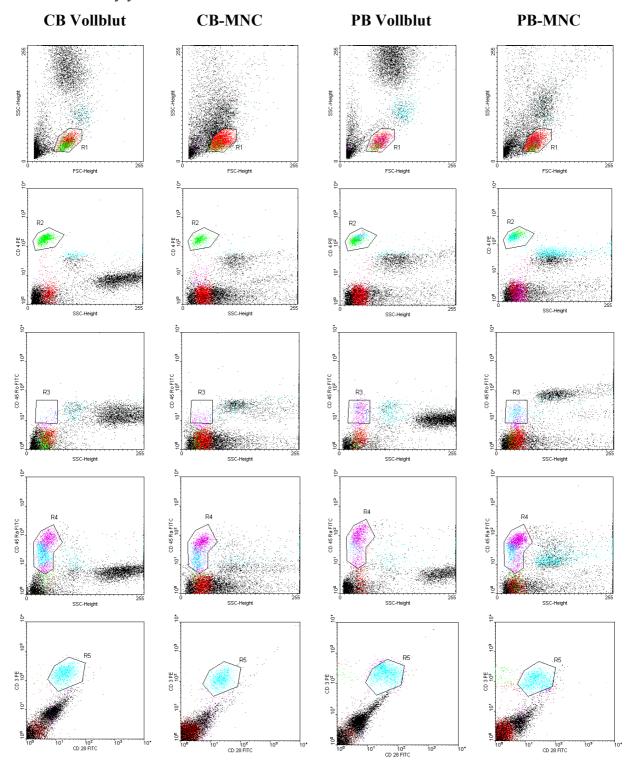


Abbildung 10: Exemplarische Darstellung von Dot-Plots der FACS Analyse von Nabelschnurblut (CB) und peripherem Blut (PB), jeweils Vollblut und MNC. Neben dem FSC/SSC Plot, der Aussagen über Größe und Granularität der Zellen erlaubt (obere Zeile), sind verschiedene Fluoreszenzfärbungen gezeigt (von oben nach unten: CD4, CD45Ro, CD45Ra, CD3/CD28). Deutlich ist der höhere Anteil von CD45Ro⁺ Zellen in PBL zu erkennen. Je 10.000 Zellen dargestellt.

Um den Anteil der Lymphozyten in CB und PB zu bestimmen, erfolgte die Bestimmung mittels FACS-Analyse zum einen bei Vollblut nach Erylyse, zum anderen bei durch Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation angereicherten MNC (Abb. 11).

Bei dem Vergleich nach Größe und Granularität eingegrenzter Lymphozyten in Vollblut nach Erylyse und in MNC zeigt sich sowohl in PB als auch in CB ein signifikant höherer Anteil von Lymphozyten in den mit Ficoll aufbereiteten Zellen im Vergleich zum Vollblut nach Erylyse. Dieser Unterschied ist bei CB größer als bei PB.

Prozentual ist der Anteil an Lymphozyten in CB in jeder Analyse höher als in PB. Bei den zusätzlich mit CD45 gefärbten Zellen ergibt sich ein geringerer Unterschied zu den jeweiligen Kontrollen ohne zusätzlichen Marker.

Die statistische Auswertung der folgenden Versuche mittels Student t-Test wurde zur besseren Veranschaulichung auch bei Versuchsergebnissen mit wenig Stichproben durchgeführt.

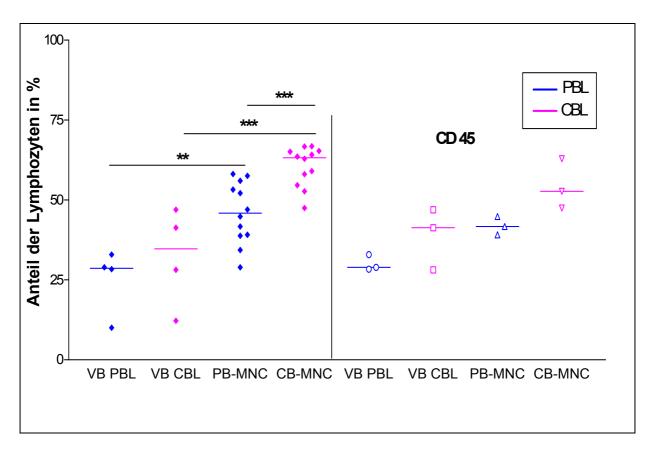


Abbildung 11: FACS Analysen des Anteils der Lymphozyten in PBL und CBL. Vollblut nach Erylyse (VB) PBL und CBL, mit Ficoll aufbereitete PBL und CBL (-MNC), zusätzlich mit CD45⁺ (CD45) markierte PBL und CBL. *P<0.05;**P<0.01; ***P<0,0001.

Eine weitere in dieser Arbeit mittels FACS untersuchte Subpopulation sind die CD4⁺-T-Lymphozyten. Man erkennt in Abbildung 12 einen signifikant höheren Anteil CD4⁺ Zellen im Vollblut nach Erylyse im Vergleich zu MNC. Die Signifikanz ist hierbei bei CBL deutlich stärker als bei PBL.

Der Anteil der CD4⁺ Zellen in PBL ist sowohl im Vollblut als auch in MNC signifikant höher als der Anteil in CBL.

Bei der zusätzlichen Färbung mit CD45 ist der Anteil der CD4⁺ Zellen in Vollblut und in MNC sowohl bei PBL als auch bei CBL annähernd gleich.

Der Anteil der CD4⁺ CB-MNC ist im Vergleich zu den zusätzlich mit CD45 gefärbten CB-MNC signifikant niedriger. In PBL ist dieser Unterschied ebenfalls zu beobachten, jedoch nicht so stark ausgeprägt.

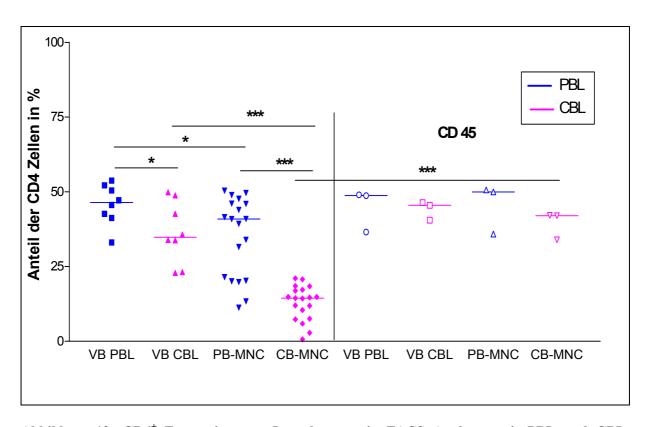


Abbildung 12: CD4⁺ Expression von Lymphozyten in FACS Analysen mit PBL und CBL. Vollblut nach Erylyse (VB) PBL und CBL, mit Ficoll aufbereitete PBL und CBL (-MNC), zusätzlich mit CD45⁺ (CD45) markierte PBL und CBL. *P<0.05;**P<0.01; ***P<0,0001.

Im Verlauf wurde auch die Subpopulation der CD3⁺/CD28⁺ Zellen analysiert. CD3⁺ Zellen sind für die Erkennung des Antigens und eine Aktivierung der T-Zelle verantwortlich. Durch CD28⁺ Zellen erfolgt eine Kostimulation in Verbindung mit CD3⁺, die T-Zellen zur Proliferation und zur Zytokinproduktion anregt.

Bei der Bestimmung der CD3⁺/CD28⁺ Zellen mittels FACS zeigen sich deutliche Unterschiede in den verschiedenen Ansätzen, ähnlich wie schon bei den CD4⁺ Zellen.

Abbildung 13 veranschaulicht einen signifikant höheren Anteil der CD3⁺/CD28⁺ im Vollblut nach Erylyse im Vergleich zu den MNC, dies ist bei CBL stärker ausgeprägt als bei PBL. Der Anteil von CD3⁺/CD28⁺ Zellen liegt in allen Analysen bei PBL höher als bei CBL.

Bei der zusätzlichen Färbung mit CD45 sind die Unterschiede weniger groß jedoch sind die Verhältnisse ähnlich. Auffällig ist, dass hier die zusätzlich CD45 gefärbten MNC bei PBL und CBL jeweils signifikant höher liegen.

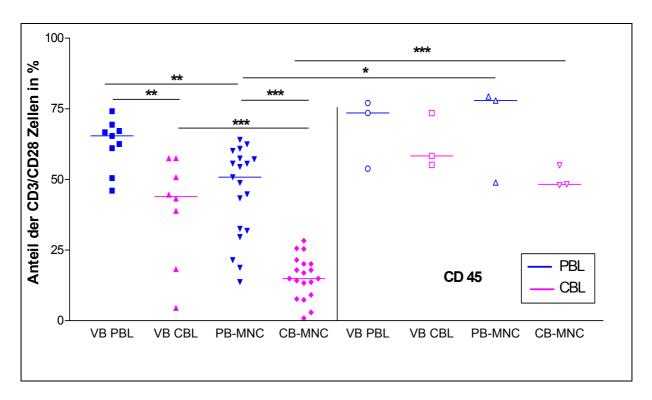


Abbildung 13: CD3⁺/CD28⁺ Lymphozyten in FACS Analysen mit PBL und CBL. Vollblut nach Erylyse (VB) PBL und CBL, mit Ficoll aufbereitete PBL und CBL (-MNC), zusätzlich mit CD45⁺ (CD45) markierte PBL und CBL. *P<0.05;**P<0.01; ***P<0,0001.

Von entscheidendem Interesse für diese Arbeit ist die Expression des Oberflächenmarkers CD45Ra⁺, der auf naiven T-Zellen exprimiert wird. Die auf Abbildung 14 dargestellte FACS-Analyse lässt erkennen, dass im Vollblut nach Erylyse und auch in allen Blutproben, die zusätzlich mit CD45 gefärbt sind, der Anteil der CD45Ra⁺ Zellen in CB höher als in PB ist. Das Niveau der zusätzlich mit CD45 gefärbten CBL und PBL ist auch signifikant höher als in den nach Lymphozyten spezifischer Größe und Granularität eingegrenzten CBL und PBL.

Bei den CB-MNC mit dem nach Größe und Granularität eingegrenzten Lymphozyten ist der Anteil der CD45Ra⁺ Zellen geringer als in PBL. In den anderen Versuchsansätzen wurde jedoch veranschaulicht, dass der Anteil an CD45Ra⁺ Zellen in CBL erheblich höher als in PBL ist.

Der Anteil der CD45Ra⁺ Zellen liegt im Vollblut nach Erylyse bei etwa 75%. Betrachtet man nur die CD45⁺ Zellen, steigt der Anteil an CD45Ra⁺ Zellen auf über 99%. Hierbei sieht man keinen signifikanten Unterschied zwischen Vollblut nach Erylyse der CBL und CB-MNC. Bei den CB-MNC, die nicht zusätzlich nach CD45⁺ eingegrenzt wurden ist der Anteil mit 75% signifikant niedriger.

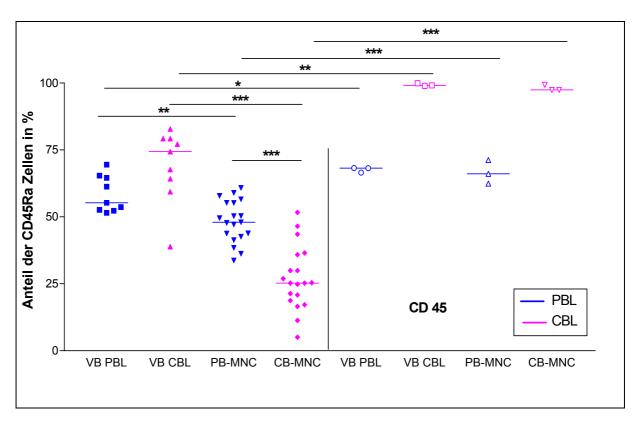


Abbildung 14: CD45Ra⁺ **Lymphozyten in FACS Analysen mit PBL und CBL**. Vollblut nach Erylyse (VB) PBL und CBL, mit Ficoll aufbereitete PBL und CBL (-MNC), zusätzlich mit CD45⁺ (CD45) markierte PBL und CBL. *P<0.05;**P<0.01; ***P<0,0001.

Abbildung 15 stellt die Expression des Oberflächenmarkers CD45Ro⁺ dar, der auf Gedächtnis-T-Zellen exprimiert wird. Im Vollblut und auch in MNC ist der Anteil der CD45Ro⁺ Zellen in PBL signifikant höher als in CBL. Auch in den nach CD45 eingegrenzten Zellen ist das Niveau der CD45Ro⁺ in PBL höher als in CBL. Hierbei unterscheiden sich die Methoden nur geringfügig.

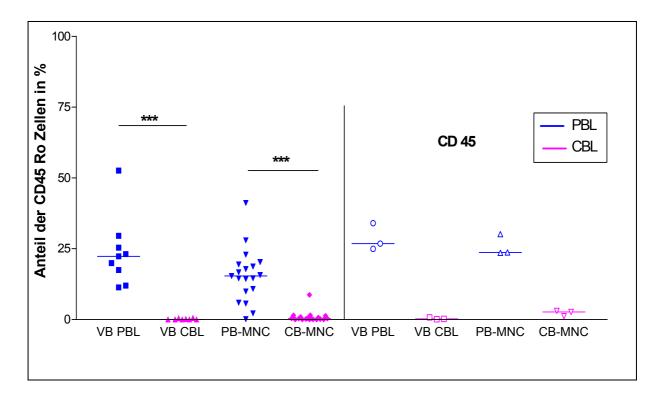


Abbildung 15: CD45Ro⁺ **Lymphozyten in FACS Analysen mit PBL und CBL**. Vollblut (VB) PBL und CBL, mit Ficoll aufbereitete PBL und CBL (-MNC), zusätzlich mit CD45⁺ (CD45) markierte PBL und CBL. *P<0.05;**P<0.01; ***P<0,0001.

Zusammenfassend kann gezeigt werden, dass mit Ficoll aufbereitete Zellen im Vergleich zu Vollblut nach Erylyse eine andere Verteilung der Populationen aufweisen. Bei der Analyse der naiven Zellen zeigen sich die Unterschiede der Methoden am deutlichsten. Insbesondere bei CBL liegt der Anteil naiver Zellen im Vollblut nach Erylyse deutlich höher als bei den MNC. Wenn man zusätzlich die nach CD45 eingegrenzten Zellen betrachtet, liegt der Anteil sowohl im Vollblut als auch in MNC noch höher.

Unabhängig von der Methode liegt der Anteil von Gedächtnis-T-Zellen in PBL signifikant über denen von CBL. Die größten Unterschiede bestehen, wenn man die mit Ficoll aufbereiteten Zellen ohne zusätzliche CD45 Färbung betrachtet.

In den folgenden Versuchen wird nicht mit Vollblut nach Erylyse, sondern mit Ficoll angereicherten Zellen gearbeitet, da dies in den Blutbanken für Nabelschnurblut ebenfalls Verwendung findet, um die klinische Relevanz dieser Arbeit zu festigen.

3.1.2 Einfluss verschiedener Stimuli auf peripheres Blut und Nabelschnurblut

Da viele Zytokine erst nach Stimulation gebildet werden, erfolgte im Verlauf die Untersuchung des Einflusses verschiedener Stimuli auf das Potential der Zytokinproduktion. Hierzu wurden mitogene (TPA und Ionomycin) und Oberflächenrezeptor stimulierende Antikörper (α -CD3 und α -CD28) in verschiedenen Kombinationen bei CBL und PBL verwendet und wie in Kapitel 2.1.5.2. beschrieben stimuliert. Die jeweilige Induktion der verschiedenen Zytokine ist auf Ebene der mRNA Expression in der Zelle mittels quantitativer rt-PCR untersucht worden (Kapitel 2.1.9.), das Zytokin-Protein-Niveau im Kulturüberstand mittels ELISA (Kapitel 2.1.12.) Hierzu erfolgte die Verwendung von PB-MNC und CB-MNC, die zuvor durch Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnen wurden (Kapitel 2.1.2). Auch in den folgenden Versuchen erfolgte die statistische Auswertung mittels Student t-Test zur besseren Veranschaulichung auch bei Versuchsergebnissen mit wenig Stichproben.

Th1-Zytokine

Für IL-2 bewirkt die Kombination von mitogenen Stimuli (TPA und Ionomycin) die höchste Induktion, sowohl in CBL als auch in PBL (Abb. 16). Das Niveau von IL-2 mRNA und Protein ist für die mitogenen Stimuli in CBL und PBL gleich. Im Gegensatz dazu ist die Stimulation der Oberflächenrezeptoren etwa zehnfach weniger effektiv in CBL. Nur die Kombination mit wenigstens einem mitogenen Stimulus kann ein ähnliches Niveau in PBL wie in CBL erreichen. Dabei ist das Vorhandensein von TPA unerlässlich, wobei TPA allein nicht ausreichend stimuliert. Es muss mindestens ein weiterer Stimulus vorhanden sein. Wenn α -CD3 oder α -CD28 zusätzlich vorhanden sind, ist die Stimulation geringfügig niedriger als wenn Ionomycin als zusätzlicher Stimulus kombiniert wird. Ein signifikanter Unterschied zwischen PBL und CBL tritt bei mRNA nur bei der Kombination von α -CD3/Iono auf, im ELISA nur bei der Kombination von α -CD3/ α -CD28.

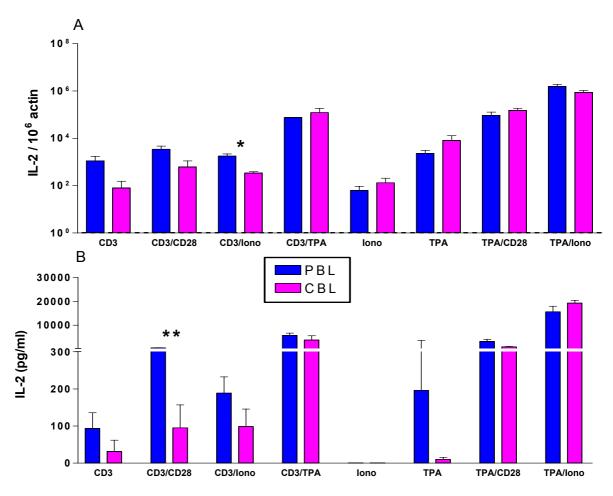


Abbildung 16: Induktion von IL-2. Das mRNA Niveau (A) wurde mittels rt-PCR nach 4 Stunden Stimulation bestimmt. Die Daten sind als beliebige Einheiten normalisiert auf β-actin dargestellt. Die Proteinmenge (B) wurde im Überstand mittels ELISA nach 24 Stunden Stimulation bestimmt. Die Balken stellen den Mittelwert und die Standardabweichung von 3 verschiedenen Spendern dar. Ähnliche Resultate wurden in 3 unabhängigen Versuchen erzielt. *P<0.05;**P<0.01 PBL vs. CBL.

Für IFN-γ ist der Unterschied zwischen CBL und PBL stärker ausgeprägt. CBL produziert weniger IFN-γ unabhängig vom verwendeten Stimulus (Abb. 18). Nur die Kombination aus TPA und Ionomycin kann IFN-γ induzieren. Das Proteinniveau ist jedoch niedriger im Vergleich mit PBL.

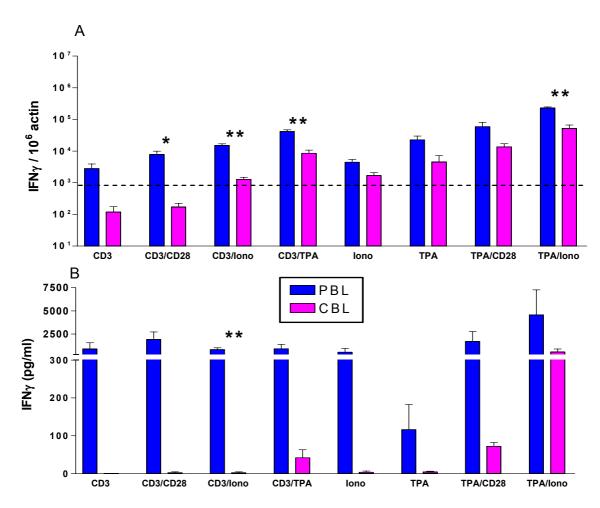


Abbildung 17: Induktion von IFNγ. Das mRNA Niveau (A) wurde mittels rt-PCR nach 4 Stunden Stimulation bestimmt. Die Daten sind als beliebige Einheiten normalisiert auf β-actin dargestellt. Die gestrichelte Linie stellt das mRNA Basisniveau dar. Die Proteinmenge (B) wurde im Überstand mittels ELISA nach 24 Stunden Stimulation bestimmt. Die Balken stellen den Mittelwert und die Standardabweichung von 3 verschiedenen Spendern dar. Ähnliche Resultate wurden in 3 unabhängigen Versuchen erzielt. *P<0.05;**P<0.01 PBL vs. CBL.

Th2-Zytokine

Als Th2-spezifische Zytokine wurden IL-4, IL-5 und IL-13 mittels rt-PCR und ELISA bestimmt. Die höchste Induktion von IL-4 wird in CBL und PBL beobachtet, wenn einer der Stimuli Ionomycin ist (Abb. 18). Jedoch produzieren CBL weitaus weniger IL-4 als PBL.

In CBL sind α -CD3 und α -CD28 als Stimuli weniger effizient bei der Induktion von Zytokinen. Das IL-4 Niveau ist generell niedriger in CBL als in PBL.

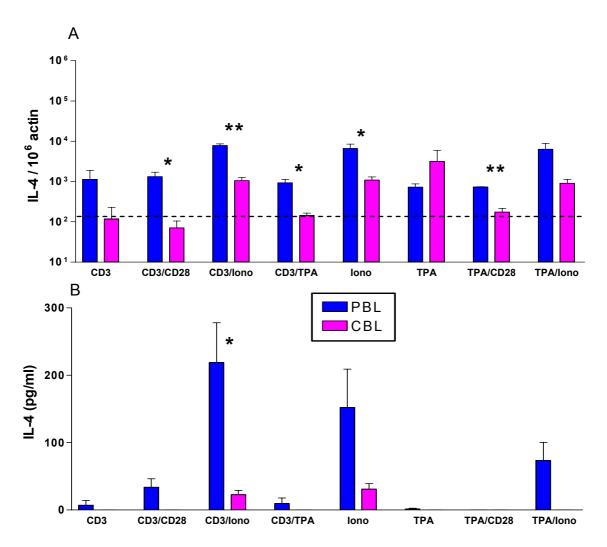


Abbildung 18: Induktion von IL-4. Das mRNA Niveau (A) wurde mittels rt-PCR nach 4 Stunden Stimulation bestimmt. Die Daten sind als beliebige Einheiten normalisiert auf β-actin dargestellt. Die gestrichelte Linie stellt das mRNA Basisniveau dar. Die Proteinmenge (B) wurde im Überstand mittels ELISA nach 24 Stunden Stimulation bestimmt. Die Balken stellen den Mittelwert und die Standardabweichung von 3 verschiedenen Spendern dar. Ähnliche Resultate wurden in 3 unabhängigen Versuchen erzielt. *P<0.05;**P<0.01 PBL vs. CBL.

IL-5 (Abb. 19) ist in CBL kaum detektierbar. In PBL erbringt nur die Kombination von zwei verschiedenen Stimuli einen detektierbaren Effekt, ein einzelner Stimulus hat keinen Effekt. Dabei ist egal, welche Stimuli zusammen verwendet werden. Das IL-5 Niveau ist generell niedriger in CBL als in PBL, was auch schon bei IL-4 beobachtet werden kann.

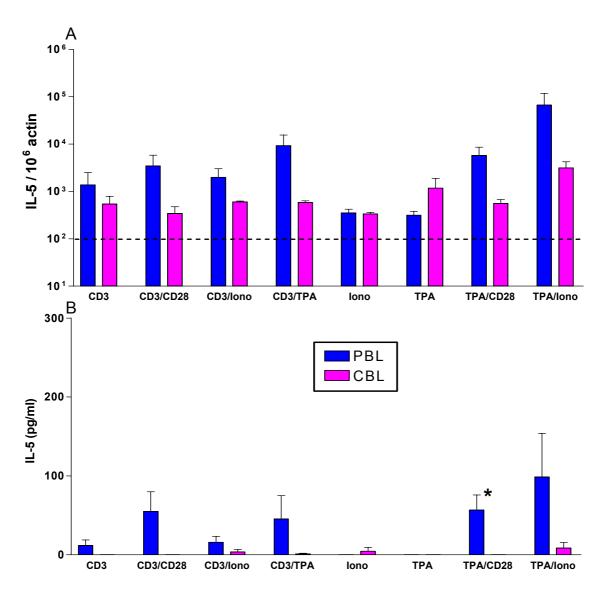


Abbildung 19: Induktion von IL-5. Das mRNA Niveau (A) wurde mittels rt-PCR nach 4 Stunden Stimulation bestimmt. Die Daten sind als beliebige Einheiten normalisiert auf β-actin dargestellt. Die gestrichelte Linie stellt das mRNA Basisniveau dar. Die Proteinmenge (B) wurde im Überstand mittels ELISA nach 24 Stunden Stimulation bestimmt. Die Balken stellen den Mittelwert und die Standardabweichung von 3 verschiedenen Spendern dar. Ähnliche Resultate wurden in 3 unabhängigen Versuchen erzielt. *P<0.05 PBL vs. CBL.

IL-13 wird in CBL nur produziert, wenn mindestens ein mitogener Stimulus Verwendung findet (Abb. 20). Im Gegensatz dazu unterscheidet sich in PBL das Niveau von IL-13 hingegen wenig zwischen den verschiedenen Stimuli. Ein gleiches oder höheres Niveau von IL-13 kann in CBL im Vergleich zu PBL beobachtet werden. Alle beobachteten Unterschiede sind in mRNA und beim Protein Niveau erkennbar.

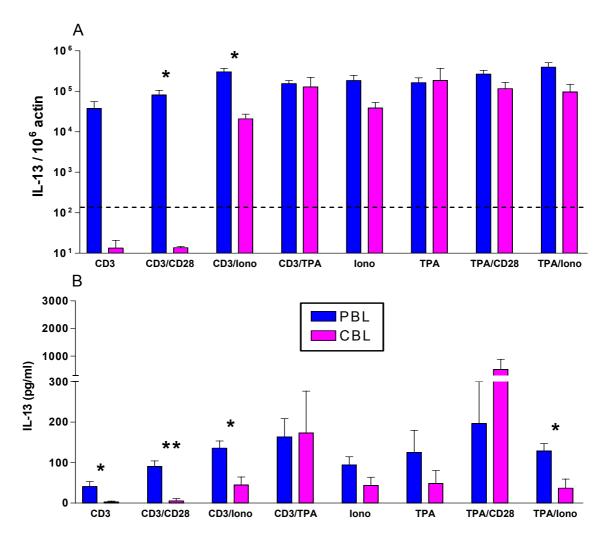


Abbildung 20: Induktion von IL-13. Das mRNA Niveau (A) wurde mittels rt-PCR nach 4 Stunden Stimulation bestimmt. Die Daten sind als beliebige Einheiten normalisiert auf β-actin dargestellt. Die gestrichelte Linie stellt das mRNA Basisniveau dar. Die Proteinmenge (B) wurde im Überstand mittels ELISA nach 24 Stunden Stimulation bestimmt. Die Balken stellen den Mittelwert und die Standardabweichung von 3 verschiedenen Spendern dar. Ähnliche Resultate wurden in 3 unabhängigen Versuchen erzielt. *P<0.05;**P<0.01 PBL vs. CBL.

Hämatopoetische Zytokine

Für die Bestimmung der Produktion von hämatopoetischen Zytokinen wurde das Niveau von IL-3 und GM-CSF in PBL und CBL bestimmt. Die stärkste Stimulation von IL-3 kann beobachtet werden, wenn Ionomycin als Stimulus vorhanden ist (Abb. 21). Die Stimulation mit α -CD3 und α -CD28 ist wirkungsvoller in PBL als in CBL, um IL-3 zu produzieren.

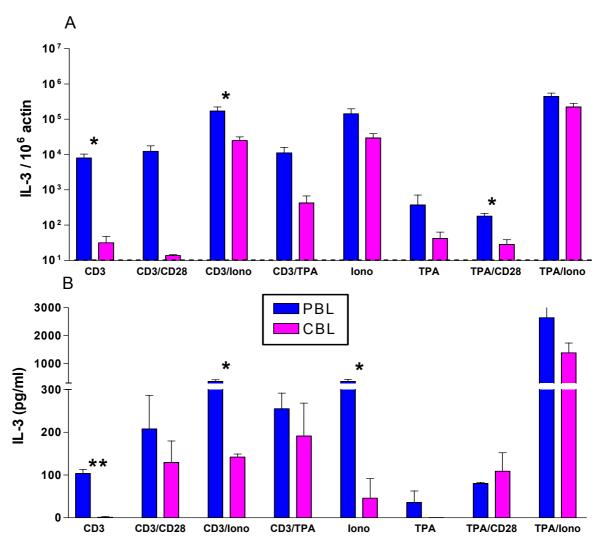


Abbildung 21: Induktion von IL-3. Das mRNA Niveau (A) wurde mittels rt-PCR nach 4 Stunden Stimulation bestimmt. Die Daten sind als beliebige Einheiten normalisiert auf β-actin dargestellt. Die Proteinmenge (B) wurde im Überstand mittels ELISA nach 24 Stunden Stimulation bestimmt. Die Balken stellen den Mittelwert und die Standardabweichung von 3 verschiedenen Spendern dar. Ähnliche Resultate wurden in 3 unabhängigen Versuchen erzielt. *P<0.05;**P<0.01 PBL vs. CBL.

Im Gegensatz zu allen anderen Zytokinen, ist GM-CSF das einzige Zytokin, das keine signifikanten Unterschiede zwischen PBL und CBL zeigt (Abb. 22). Dies gilt sowohl für mRNA, als auch für das Protein Niveau. Mitogene Stimulation induzierte ein sehr viel höheres Niveau an GM-CSF als Oberflächenrezeptor Stimulation allein.

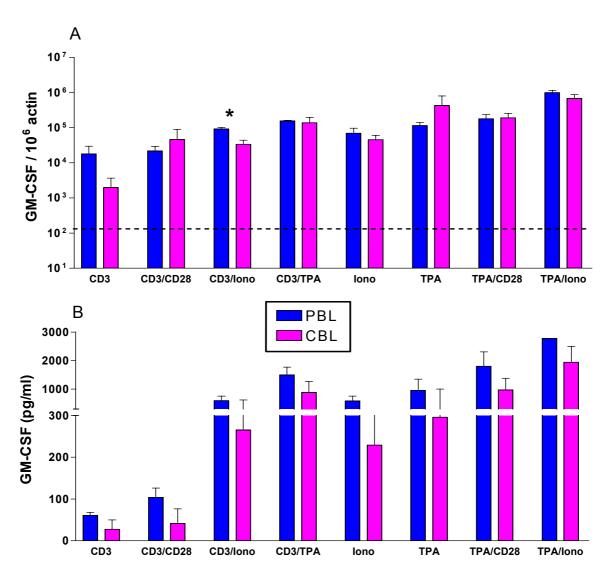


Abbildung 22: Induktion von GM-CSF. Das mRNA Niveau (A) wurde mittels rt-PCR nach 4 Stunden Stimulation bestimmt. Die Daten sind als beliebige Einheiten normalisiert auf β-actin dargestellt. Die gestrichelte Linie stellt das mRNA Basisniveau dar. Die Proteinmenge (B) wurde im Überstand mittels ELISA nach 24 Stunden Stimulation bestimmt. Die Balken stellen den Mittelwert und die Standardabweichung von 3 verschiedenen Spendern dar. Ähnliche Resultate wurden in 3 unabhängigen Versuchen erzielt. *P<0.05;**P<0.01 PBL vs. CBL.

3.1.3 Kinetik der Zytokininduktion

Unterschiede in der Expression von Zytokinen zwischen CBL und PBL können von der unterschiedlichen Kinetik der Induktion stammen. Dafür erfolgte die Analyse des mRNA Niveaus mittels rt-PCR zu verschiedenen Zeitpunkten, bis zu 4 Tagen nach Stimulation. Da TPA, wie in vorherigen Versuchen gezeigt wurde, in Kombination mit Ionomycin alle Zytokine in detektierbarer Weise stimuliert, erfolgte für die Kinetikversuche ausschließlich diese Kombination der Stimulation.

Th1-Zytokine

Die Th1-spezifischen Zytokine IL-2 und IFNγ erreichen ein maximales mRNA Niveau 6 Stunden nach Stimulation in PBL. In CBL wird das Maximum nach 24 Stunden erreicht (Abb. 23). Das erhöhte Niveau besteht nahezu konstant über den weiteren Beobachtungszeitraum von 4 Tagen. Der Unterschied zwischen PBL und CBL in der Expression ist bei jedem Messzeitpunkt etwa 10fach, wobei in PBL die Expression höher ist als in CBL. Am vierten Tag nähert sich das mRNA Niveau von CBL dem PBL Niveau fast auf gleicher Höhe an.

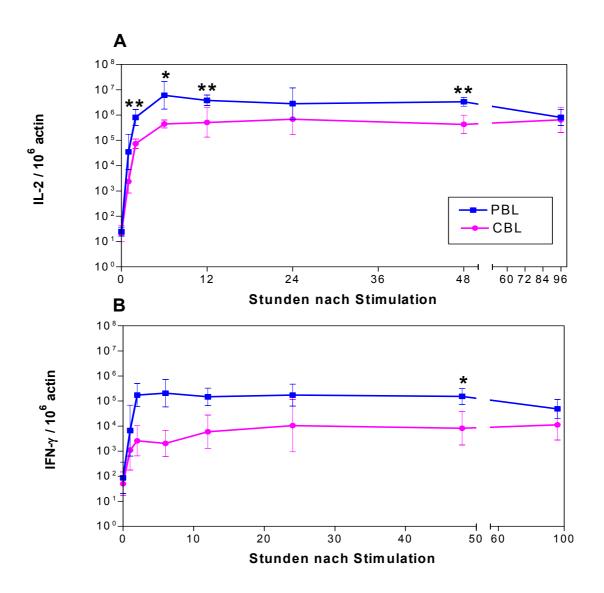


Abbildung 23: Kinetik der Zytokininduktion für Th1-Zytokine. Die Zellen sind mit TPA und Ionomycin stimuliert. Nach bestimmten Zeitabständen wurden PBL und CBL geerntet und lysiert. Das mRNA Niveau wurde mittels rt-PCR bestimmt. Die Daten sind als beliebige Einheiten normalisiert auf ß-actin dargestellt. Die einzelnen Datenpunkte stellen den Mittelwert und die Standardabweichung von 6 verschiedenen Spendern dar. *P<0.05;**P<0.01 PBL vs. CBL.

Th2-Zytokine

Die Expression Th2-spezifischer Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 (Abb. 24) steigt bis zur 6. Stunde auf ein Maximum an und sinkt bei allen im Zeitverlauf stetig langsam ab.

IL-4 erreicht sein Maximum sowohl in CBL als auch in PBL nach zwei Stunden. IL-5 hingegen erreicht sein Maximum in PBL nach 6, in CBL erst nach 12 Stunden. IL-15 wird nach 6 Stunden in PBL und nach zwei Stunden in CBL maximal exprimiert. Im zeitlichen Verlauf ist insgesamt nur ein leichtes Absinken der Expression zu verzeichnen, wobei der Abfall nach Erreichen des Maximums überall am stärksten ist.

Die verschiedenen Expressionsniveaus zwischen CBL und PBL differieren um das Hundertfache für IL-4 und IL-5 und um das Zehnfache bei IL-13. Am vierten Tag näherte sich das mRNA Niveau von IL-13 von CBL dem PBL Niveau fast auf gleicher Höhe an. Dies ist nicht bei IL-4 und IL-5 zu beobachten.

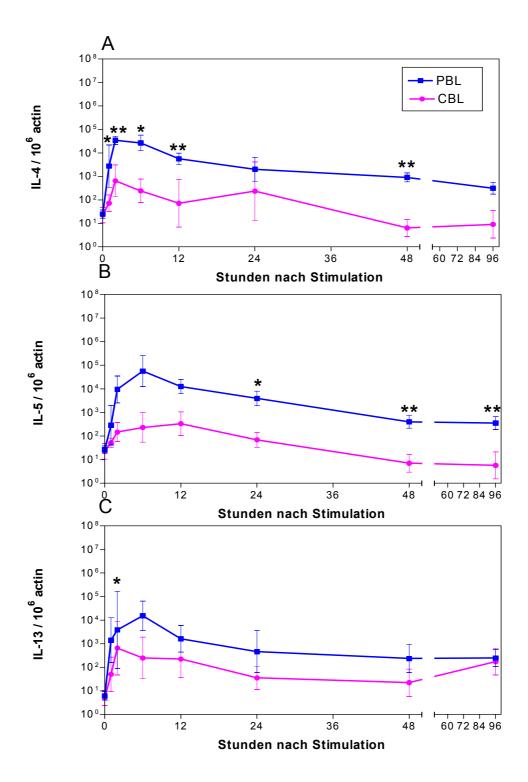


Abbildung 24: Kinetik der Zytokininduktion für Th2-Zytokine. Die Zellen sind mit TPA und Ionomycin stimuliert. Nach bestimmten Zeitabständen wurden PBL und CBL geerntet und lysiert. Das mRNA Niveau wurde mittels rt-PCR bestimmt. Die Daten sind als beliebige Einheiten normalisiert auf β-actin dargestellt. Die einzelnen Datenpunkte stellen den Mittelwert und die Standardabweichung von 6 verschiedenen Spendern dar. *P<0.05;**P<0.01 PBL vs. CBL.

Hämatopoetische Zytokine

Bei der Expression der hämatopoetisch aktiven Zytokine IL-3 und GM-CSF wird ein bezeichnender Unterschied im Vergleich zu Th1-und Th2-Zytokinen gefunden. CBL zeigen eine verzögerte Kinetik für IL-3 and GM-CSF, die bei 12 Stunden ihr Maximum erreicht (Abb. 25). Im Unterschied dazu erreicht die mRNA Expression in PBL eine Erhöhung bei 6 Stunden, einen leichten Abfall bis 12 Stunden, um das Maximum dann bei 48 Stunden zu erreichen. Das IL-3 Niveau in PBL und CBL ist nach 12 Stunden etwa gleich. Vor und nach diesem Zeitpunkt divergieren sie, wobei PBL jeweils ein höheres Niveau zeigt. Für alle Versuche ist dies das einzige Mal, bei dem die Zytokinexpression bei PBL und CBL das gleiche Niveau erreicht.

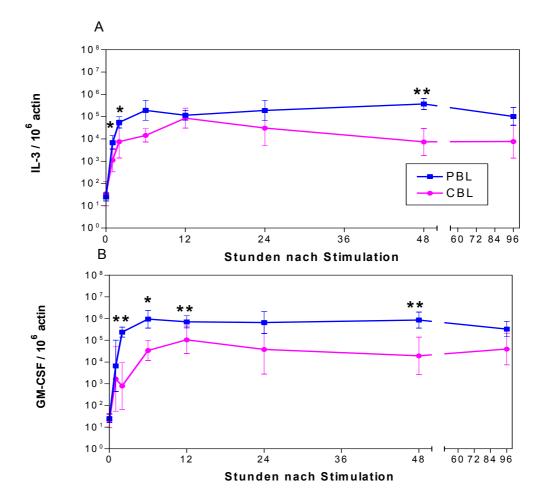
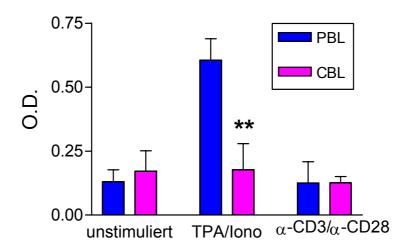


Abbildung 25: Kinetik der Zytokininduktion für hämatopoetische Zytokine. Die Zellen sind mit TPA und Ionomycin stimuliert. Nach bestimmten Zeitabständen wurden PBL und CBL geerntet und lysiert. Das mRNA Niveau (A,B) wurde mittels rt-PCR bestimmt. Die Daten sind als beliebige Einheiten dargestellt, normalisiert auf β-actin zur Korrektur für die RNA Quantität und Integrität. Die einzelnen Datenpunkte stellen den Mittelwert und die Standardabweichung von 6 verschiedenen Spendern dar. *P<0.05;**P<0.01 PBL vs. CBL.

3.1.4 Aktivierung von Transkriptionsfaktoren in Nabelschnurblut

Da sich in den Versuchen gezeigt hat, dass sowohl weniger Protein als auch weniger mRNA der untersuchten Zytokine von CBL produziert wird, stellte sich die Frage, ob die Expression der für Zytokine relevanten Transkriptionsfaktoren in CBL ebenfalls vermindert ist.

Zuerst erfolgte die Analyse der Aktivierung eines allgemeineren Transkriptionsfaktors, NF- κ B. Dazu wurde die DNA-Bindungsaktivität dieses Proteins der an DNA gebundenen Transkriptionsfaktormoleküle in Kernextrakten mittels ELISA bestimmt, wie in Kapitel 2.1.10-2.1.12. beschrieben. Abbildung 26 zeigt die Grundaktivität von NF- κ B, die in PBL und CBL etwa gleich ist. TPA und Ionomycin stimulierten die Aktivität von NF- κ B in PBL. In CBL wird kaum eine Aktivierung erreicht. Die Stimulation mit α -CD3/ α -CD28 führt zu keiner auffälligen Aktivierung.



Stimulation

Abbildung 26: Bindungsaktivität von NF-κB. 60 Minuten nach der Stimulation wurden die Kernextrakte präpariert. Die Bindungsaktivität von NF-κB p50 DNA wurde durch ELISA, wie im Methodenteil beschrieben, bestimmt. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert und die Standardabweichung von 3 verschiedenen Spendern. **P<0.01 PBL vs. CBL.

3.1.5 Unterschiede in der Expression der Transkriptionsfaktoren

Da CBL weniger Th2-Zytokine produzierten (Kapitel 3.1.2 und 3.1.3), wurde untersucht, ob die Expression der Th-Untergruppen spezifischen Transkriptionsfaktoren in CBL und PBL verschieden ist.

T-bet wurde als Th1-spezifischer Transkriptionsfaktor beschrieben (Szabo et al., 2002). Da zur Zeit der Versuchsdurchführung keine Antikörper gegen humanes T-bet bereitstanden, wurde die Expression der mRNA von T-bet nach unterschiedlichen Stimulationen in CBL und PBL mittels rt-PCR bestimmt (Abb. 27). Es findet sich ein spezifischer Defekt in der Expression von T-bet in CBL nach antigener Stimulation. Nach Stimulation mit TPA bleibt das Niveau der Expression in CBL und PBL gleich. Vergleicht man die Muster der Expression mit denen der Th1-spezifischen Zytokine, IL-2 und IFN- γ , sieht man deutliche Übereinstimmungen (vergleiche Abb. 16 und 17). Dies wird gestützt durch die Korrelation der Expression von T-bet und IFN- γ ($r^2 = 0.68$; p < 0.0001). Bei dem Th2-spezifischen Zytokin IL-4 ($r^2 = 0.01$) zeigt sich hingegen keine Korrelation mit T-bet (Abb. 26, Nebenbild).

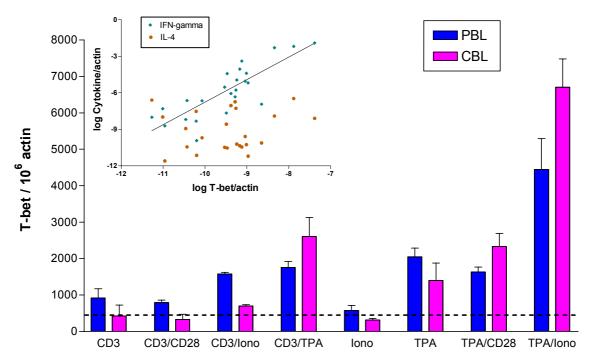


Abbildung 27: Induktion des Transkriptionsfaktors T-bet. PBL und CBL wurden 4 Stunden stimuliert. Das mRNA Niveau von T-bet wurden mittels rt-PCR bestimmt. Die Daten sind als beliebige Einheiten normalisiert auf β-actin bestimmt. Die Balken stellen den Mittelwert und die Standardabweichung von 3 verschiedenen Spendern dar. Das Nebenbild zeigt die Korrelation der Expression des Transkriptionsfaktors T-bet mit IFN-γ und IL-4. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das basale Transkriptionsniveau ohne Stimulation.

Abbildung 28 stellt die Expression von c-maf dar, welches als Th2-spezifischer Transkriptionsfaktor beschrieben ist und als solcher den Promoter von IL-4 aktiviert (Ho et al., 1998). Das Expressionsmuster von c-maf spiegelt das Expressionsmuster der Th2-spezifischen Zytokine wider (vergleiche Abb. 18-20). Der Korrelationskoeffizient von c-maf mit IL-4 ist $r^2 = 0.76$ (p < 0.0001), mit IFN- γ als Th1-spezifisches Zytokin konnte keine signifikante Korrelation mit c-maf beobachtet werden ($r^2 = 0.02$) (Abb. 28, Nebenbild).

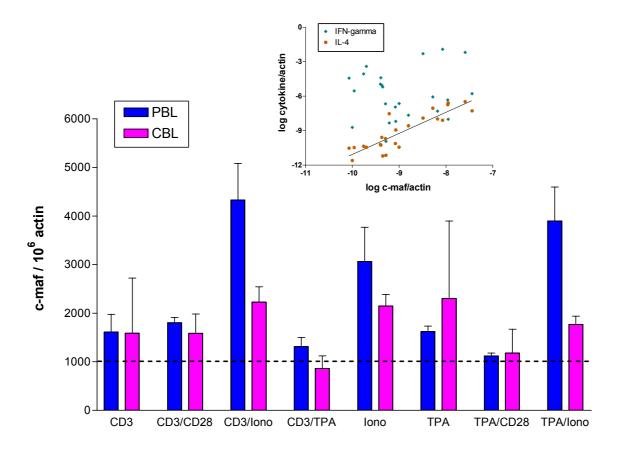


Abbildung 28: Induktion des Transkriptionsfaktors c-maf. PBL und CBL wurden 4 Stunden stimuliert. Das mRNA Niveau von c-maf wurden mittels rt-PCR bestimmt. Die Daten sind als beliebige Einheiten normalisiert auf β-actin bestimmt. Die Balken stellen den Mittelwert und die Standardabweichung von 3 verschiedenen Spendern dar. Das Nebenbild zeigt die Korrelation der Expression des Transkriptionsfaktors c-maf mit IFNg und IL-4. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das basale Transkriptionsniveau ohne Stimulation.

Die Expression von GATA-3, einem weiteren Th2-spezifischen Transkriptionsfaktor, korrelierte weder signifikant mit der Expression von IFN-γ, noch mit der von IL-4 (Abb. 29, Nebenbild). Die Stimulation dieses Transkriptionsfaktors ist bei CBL stärker ausgeprägt, wobei kein unmittelbarer Funktionsdefekt unterstellt werden kann.

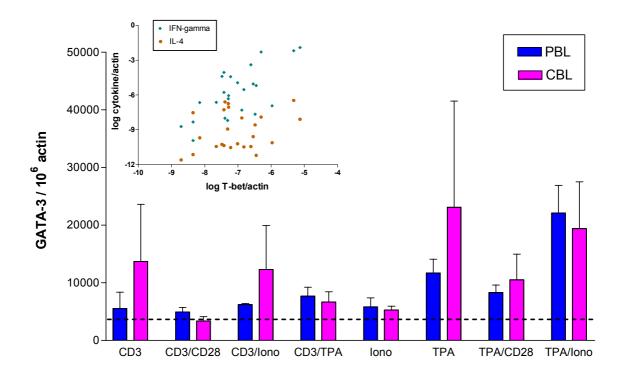


Abbildung 29: Induktion des Transkriptionsfaktors GATA-3. PBL und CBL wurden 4 Stunden stimuliert. Das mRNA Niveau von GATA-3 wurden mittels rt-PCR bestimmt. Die Daten sind als beliebige Einheiten normalisiert auf ß-actin bestimmt. Die Balken stellen den Mittelwert und die Standardabweichung von 3 verschiedenen Spendern dar. Das Nebenbild zeigt die Korrelation der Expression des Transkriptionsfaktors GATA-3 mit IFNg und IL-4. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das basale Transkriptionsniveau ohne Stimulation.

3.1.6 Kinetik der Induktion von Transkriptionsfaktoren

Von Interesse war auch der Zeitverlauf der Expression der Transkriptionsfaktoren nach TPA/Ionomycin Stimulation. Dabei steigt die Expression von T-bet in CBL und PBL gleichartig in den ersten sechs Stunden an und fällt nach 24 Stunden wieder ab (Abb. 30). Das Niveau ist in CBL nur geringfügig niedriger als in PBL.

Im Gegensatz dazu steigert die Stimulation mit TPA/Ionomycin die Expression von c-maf und GATA-3 nur in PBL. Das Niveau in CBL ist nahezu konstant. Der Zeitverlauf der PBL ist für c-maf und GATA-3 ähnlich wie bei T-bet, wo ein rascher Anstieg innerhalb der ersten 6 Stunden verzeichnet werden kann und es nach 24 Stunden wieder zu einem Abfall der Expression kommt.

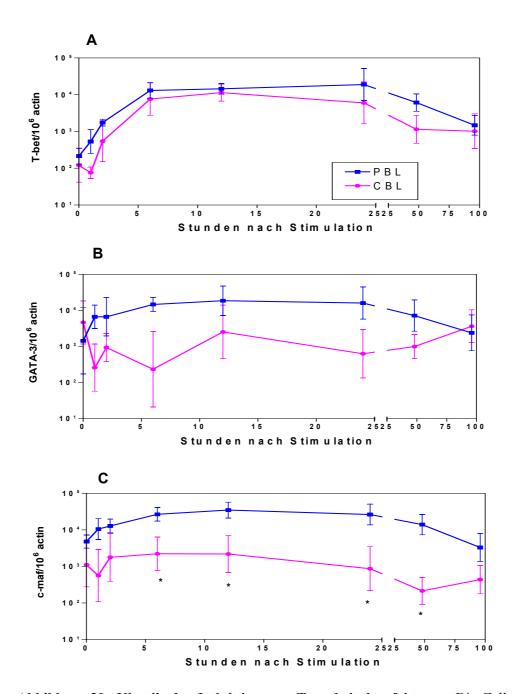


Abbildung 30: Kinetik der Induktion von Transkriptionsfaktoren. Die Zellen wurden mit TPA und Ionomycin stimuliert. Nach bestimmten Zeiten wurden die PBL und CBL geerntet und lysiert. Das mRNA Niveau wurde für T-bet (A), GATA-3 (B), and c-maf (C) bestimmt. Die Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert und die Standardabweichung von 6 verschiedenen Spendern. *P<0.05 PBL vs. CBL.

Zusammenfassend konnte in den Versuchen veranschaulicht werden, dass Th1-, Th2-spezifische und hämatopoetische Zytokine in CBL ein niedrigeres Niveau zeigen als in PBL und dies auch mit den zugehörigen Transkriptionsfaktoren korreliert. Lediglich IL-2 und GM-CSF zeigten in CBL und PBL ein gleiches Niveau.

3.2 Einfluss von HHV-6 auf die Zytokinproduktion

Zur Fragestellung, ob eine Infektion mit HHV-6 das Zytokinmuster in CBL und PBL verändert und somit Einfluss auf eine GVHD nach KMT haben könnte, wurden zuerst IFA's von Infektionen gemacht, um Informationen über die Entwicklung einer Infektion im zeitlichen Verlauf zu erhalten.

3.2.1 Nachweismethoden von HHV-6

Präparate infizierter und nicht infizierter Zellen wurden wie unter 2.1.8.1. beschrieben mit dem mAb H-AR-2 gefärbt und mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (cLSM) hinsichtlich Spezifität der Signale, deren Intensität und erkennbarer Lokalisation ausgewertet. Die Färbekontrollen wurden analog durchgeführt, jedoch ohne Inkubation mit HHV-6 spezifischen Primär-Antikörper. Als Gegenfärbung wurde EVANS-Blue verwendet, welches Zellkerne rot markiert.

Abbildung 31 zeigt exemplarisch die einzelnen Fluoreszenzsignale für HHV-6 mAb H-AR-2 (grün) und EVANS-Blue (rot) post Infectionem (p.I.).

Die Signale mit mAb H-AR-2 sind sehr intensiv und deutlich im Zytoplasma infizierter Zellen lokalisiert. Da der mAb H-AR-2 an das virale Glykoprotein gp60/110 bindet, welches in der Virushülle und in der Membran infizierter Zellen zu finden ist, zeigt dieser mAb späte Ereignisse des Infektionszyklus an. Dabei fällt auf, dass die Antigen positiven Zellen oft deutlich größer sind als nicht infizierte Zellen, d.h. sie weisen den typischen zytopathischen Effekt auf (CPE).

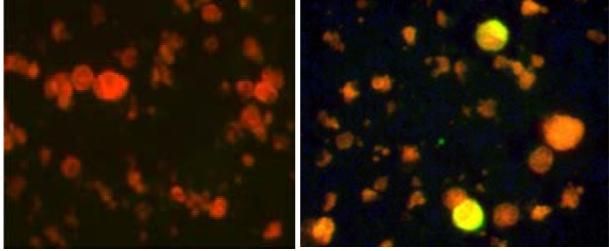


Abbildung 31: cLSM Aufnahme HHV-6B infizierter CB-MNC 3 Tage p.I. (links) und 13 Tage p.I. (rechts) nach IFA mit mAb. H-AR-2 (500x).

Die Bestimmung der vitalen Zellzahl erfolgte mittels der Trypanblau-Methode. Trypanblau kann die beschädigte Zellmembran der toten Zellen durchdringen und sie auf diese Weise blau anfärben, wobei die lebenden Zellen ungefärbt bleiben.

Abbildung 32 stellt den prozentualen Anteil toter Zellen im zeitlichen Ablauf einer Infektion von CBL mit HHV-6 Viren der Variante A und B dar.

Auch schon uninfizierte CBL weisen nach 14 Tagen einen Anteil von 20% toten Zellen auf. Bei CBL, die mit HHV-6 Variante A infiziert wurden, liegt der prozentuale Anteil toter Zellen nach 14 Tagen bei 36%. Die mit HHV-6 Variante B infizierten Zellen weisen nur einen Anteil von 24% toten Zellen auf.

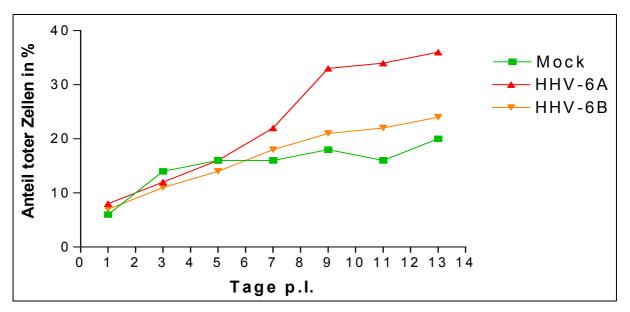


Abbildung 32: Anteil toter Zellen in der Zellkultur in einer Zeitspanne von 13 Tagen. CBL: Uninfizierte Zellen (Mock), mit HHV-6 Variante A infizierte Zellen (HHV-6A), mit HHV-6 Variante B infizierte Zellen (HHV-6B). Ähnliche Resultate wurden in 3 unabhängigen Versuchen erzielt.

Abbildung 33 veranschaulicht den prozentualen Anteil infizierter Zellen im zeitlichen Ablauf einer Infektion von CBL mit HHV-6 Viren der Variante A und B.

Nach H-AR-2 Färbung kann man unter dem Mikroskop nach 7 Tagen erste infizierte Zellen sehen. Das gilt sowohl für die Infektion mit HHV-6A als auch für HHV-6B. Der prozentuale Anteil infizierter Zellen bei der Infektion mit HHV-6A liegt nach 13 Tagen bei 25%. Bei der Infektion mit HHV-6B sind nach 13 Tagen etwa 20% der CBL infiziert.

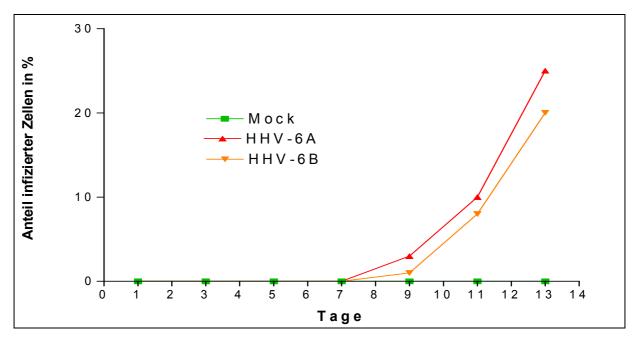


Abbildung 33: Anteil infizierter Zellen im IFA-Präparat in einer Zeitspanne von 13 Tagen. CBL: Uninfizierte Zellen (Mock), mit HHV-6 Variante A infizierte Zellen (HHV-6A), mit HHV-6 Variante B infizierte Zellen (HHV-6B). Ähnliche Resultate wurden in 3 unabhängigen Versuchen erzielt.

3.2.2 HHV-6 als möglicher Stimulus der Zytokininduktion

Im folgenden Versuchsansatz sollte herausgefunden werden, ob HHV-6 der Varianten A und B einen stimulierenden Effekt auf die Expression von einzelnen Zytokinen haben. Hierbei wurde, wie im Methodenteil unter 2.1.5.5 beschrieben, eine Infektion von CBL mit zellfreiem virushaltigen Kulturüberstand durchgeführt. Dabei erfolgte die Infektion von 1 x 10⁶ CBL mit 1 ml zellfreiem, virushaltigen Kulturüberstand sowie 1:5 verdünntem zellfreien, virushaltigen Kulturüberstand. Im Folgenden ist exemplarisch einer von 3 Versuchen dargestellt. In den anderen Versuchen fanden sich vergleichbare Ergebnisse.

Th1-Zytokine

Abbildung 34 zeigt auf mRNA Ebene, dass die Expression von IL-2 weder durch eine Infektion mit HHV-6A, noch mit HHV-6B gesteigert wird.

Die Expression von IFN-γ wird kurzzeitig von HHV-6B stimuliert, wobei das Maximum bei zwei Stunden liegt, wonach es zu einem Abfall kommt. Auch der 1:5 verdünnte infizierte Kultur- überstand löst noch einen diskreten Effekt der selben Art aus.

Sowohl der unverdünnte, als auch der 1:5 verdünnte, infizierte Kulturüberstand von HHV-6A lösen eine verstärkte Expression von IFN-γ aus. Dabei liegt das Maximum bei 12 Stunden, in der Verdünnung bei 6 Stunden, um danach wieder rasch abzufallen. Jedoch bleibt das Niveau über den gesamten Zeitverlauf über dem der Kontrolle mit uninfizierten Zellen.

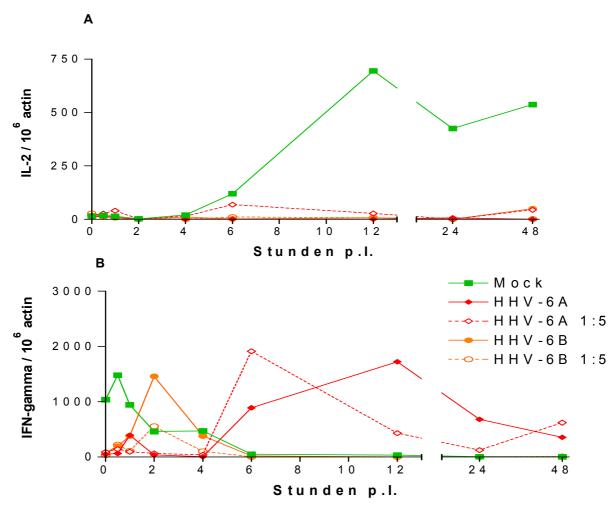


Abbildung 34: Kurzzeitkinetik Th1-spezifischer Zytokine mit HHV-6 Infektionen. Infektion von 1 x 10⁶ CBL mit 1 ml zellfreiem, virushaltigen Kulturüberstand sowie 1:5 verdünntem zellfreien, virushaltigen Kulturüberstand. Uninfizierte Zellen (Mock), mit HHV-6 Variante A infizierte Zellen (HHV-6A), verdünnt (HHV-6A A 1:5), mit HHV-6 Variante B infizierte Zellen (HHV-6B), verdünnt (HHV-6B 1:5). Ähnliche Resultate wurden in 3 unabhängigen Versuchen erzielt.

Th2-Zytokine

Abbildung 35 veranschaulicht die Expression von Th2-Zytokinen, IL-4 und IL-10, nach Infektion mit HHV-6A und B im Zeitverlauf bis 48 Stunden. Dabei zeigte sich, dass bei der Infektion mit HHV-6A und B eine vermehrte Expression von IL-4 und IL-10 beobachtet werden kann.

Bei IL-4 findet sich der deutlichste Effekt bei der Infektion mit HHV-6A mit einem Maximum der Expression nach zwei Stunden. Auch in der Verdünnung ist dieser Verlauf zu beobachten. Bei der Infektion mit HHV-6B ist die vermehrte Expression von IL-4 schwächer.

Bei IL-10 führt ebenfalls die Infektion mit HHV-6A, mit einem Maximum bei 12 Stunden, zu den deutlichsten Veränderungen. Auch der 1:5 verdünnte Infizierte Kulturüberstand zeigte noch einen deutlichen Einfluss bei 12 Stunden. Bei der Stimulation mit HH-V 6 B stellt sich nur eine leicht erhöhte Expression von IL-10 mit einem Anstieg nach 12 Stunden dar.

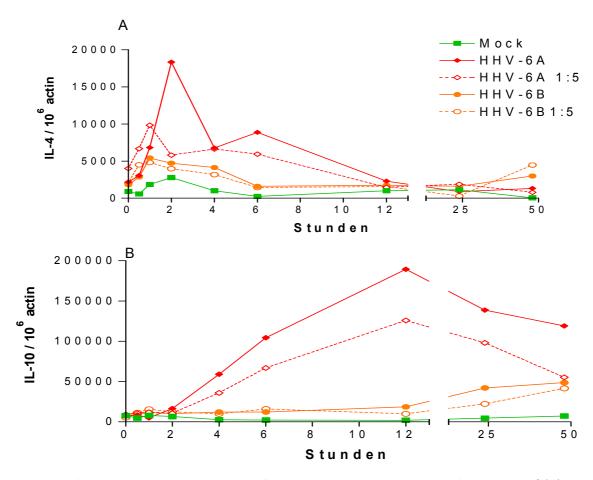


Abbildung 35: Kurzzeitkinetik Th2-spezifischer Zytokine mit HHV-6 Infektionen. Infektion von 1 x 10⁶ CBL mit 1 ml zellfreiem, virushaltigen Kulturüberstand sowie 1:5 verdünntem zellfreien, virushaltigen Kulturüberstand. Uninfizierte Zellen (Mock), mit HHV-6 Variante A infizierte Zellen (HHV-6A), verdünnt (HHV-6A A 1:5), mit HHV-6 Variante B infizierte Zellen (HHV-6B), verdünnt (HHV-6B 1:5). Ähnliche Resultate wurden in 3 unabhängigen Versuchen erzielt.

Hämatopoetische Zytokine

Bei der Betrachtung der hämatopoetischen Zytokine (Abb. 36) stellt sich ebenfalls ein Effekt dar, ähnlich wie bei den Th2-Zytokinen. Dabei wird eine verstärkte Expression von GM-CSF bei Stimulation mit HHV-6A nach 6 Stunden beobachtet, gefolgt von einem ebenso schnellen Abfall. Auch die 1:5 Verdünnung führt zu den gleichen, wenn auch abgeschwächten Veränderungen.

Im Vergleich zu den uninfizierten CBL findet sich in der Expression von GM-CSF bei Infektion mit HHV-6B kein nennenswerter Effekt.

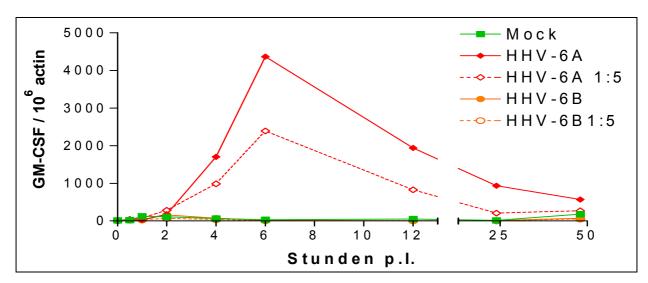


Abbildung 36: Kurzzeitkinetik des hämatopoetisch spezifischen Zytokins GM-CSF mit HHV-6 Infektionen. Infektion von 1 x 10⁶ CBL mit 1 ml zellfreiem, virushaltigen Kulturüberstand sowie 1:5 verdünntem zellfreien, virushaltigen Kulturüberstand. Uninfizierte Zellen (Mock), mit HHV-6 Variante A infizierte Zellen (HHV-6A), verdünnt (HHV-6A A 1:5), mit HHV-6 Variante B infizierte Zellen (HHV-6B), verdünnt (HHV-6B 1:5). Ähnliche Resultate wurden in 3 unabhängigen Versuchen erzielt.

Zusammenfassend fand sich in den Versuchen mit HHV-6Als Stimulus über einen kurzen Zeitverlauf bis 48 Stunden, dass der Einfluss von HHV-6A auf alle untersuchten Zytokine deutlicher als der Effekt von HHV-6B im Sinne einer vermehrten Expression einzelner Zytokine ist. Dabei konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen Th1-und Th2-spezifischen oder hämatopoetischen Zytokinen beobachtet werden.

3.2.3 HHV-6 Langzeitkinetik und Stimulation

Um den Einfluss unterschiedlich wirkender Stimuli und ihre Auswirkungen auf die Infektion mit HHV-6 zu untersuchen, wurde wie schon in den vorherigen Versuchen eine Kombination mitogener Stimuli TPA/Ionomycin (TI) oder Oberflächenrezeptor stimulierender Substanzen α -CD3/ α -CD28 (CD) zugegeben. Da in den Versuchen ohne HHV-6 Infektion eine vermehrte Produktion einiger Zytokine unter Stimulation beobachtet werden konnte, war die Auswirkung der HHV-6 Infektion im Vergleich hierzu von Interesse. Insbesondere die Kombination TPA/Ionomycin hatte zu einer vermehrten Zytokinproduktion geführt.

Th1-Zytokine

Abbildung 37 stellt für IL-2 und IFN-γ den Einfluss der unterschiedlich wirkenden Stimuli auf CBL, die mit zellfreiem, virushaltigen Kulturüberstand von HHV-6A und HHV-6B infiziert wurden dar. Dabei zeigte sich, dass sowohl die mitogene Stimulation, als auch die Stimulation der Oberflächenrezeptoren keine Steigerung oder Verminderung einer Infektion mit HHV-6 herbeiführen.

Bei IL-2 ist das Niveau mit und ohne Infektion nahezu gleich in Höhe und Verlauf. Die unstimulierten Zellen liegen über den stimulierten CBL.

In Abbildung 37 B, D, F liegt das Niveau der infizierten Zellen höher als in der uninfizierten Kontrollgruppe. Die zeitlichen Verläufe stellen sich nahezu gleich dar.

Im Bezug auf die Kurzzeitkinetik (Kapitel 3.2.2) erfolgt bei IL-2 weder eine Veränderung durch Stimulation genauso wenig wie durch Infektion. Bei IFN-γ ist das Niveau von HHV-6A und B wie in der Kurzzeitkinetik über dem der uninfizierten Zellen, jedoch besteht kein nennenswerter Unterschied zwischen HHV-6A und B.

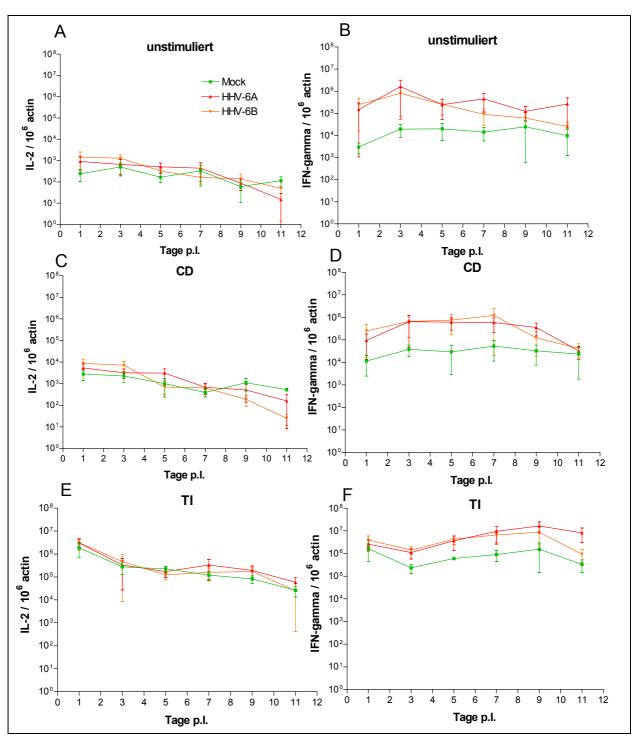


Abbildung 37: Th1-Zytokine infizierter und stimulierter CBL. Infektion von 1 x 10^6 CBL mit 1 ml zellfreiem, virushaltigen Kulturüberstand. Uninfizierte Zellen (Mock), mit HHV-6 Variante A infizierte Zellen (HHV-6A), mit HHV-6 Variante B infizierte Zellen (HHV-6B). Jeweils IL-2 und IFN- γ unstimuliert (Abb. A,B), mit α -CD3/ α -CD28 stimuliert (CD) (Abb. C,D) und mit TPA/Ionomycin (TI) stimuliert (Abb. E,F). Mittelwert und Standardabweichung aus 3 Parallelansätzen. Ähnliche Resultate wurden in 3 unabhängigen Versuchen erzielt.

Th2-Zytokine

Als Th2-spezifische Zytokine wurde IL-4 (Abb. 38 A,C,E) und IL-10 (Abb. 38 B,D,F) bezüglich des Effektes der unterschiedlich wirkenden Stimuli auf CBL beobachtet. Hierbei gab es erneut die mit zellfreiem virushaltigem Kulturüberstand von HHV-6A und HHV-6B infizierten Zellen sowie die uninfizierte Kontrolle.

Die uninfizierten Zellen halten sich bei allen Stimulationen im zeitlichen Verlauf stabil auf einem Niveau. Dabei ist das Niveau bei der Stimulation mit TPA/Ionomycin höher als bei unstimulierten und mit α -CD3/ α -CD28 stimulierten CBL.

Bei den infizierten Zellen kommt es im zeitlichen Verlauf zu einem Abfall von IL-4, der bei Infektion mit HHV-6B früher eintritt als bei Infektion mit HHV-6A. Dies ist auch bei der Stimulation mit α -CD3/ α -CD28 zu beobachten, wo der Abfall nach anfänglicher Stabilität erst später einsetzt. Bei der Stimulation mit TPA/Ionomycin ist dies nicht zu beobachten.

Keine Art der Stimulation führt bei IL-10 zu einem deutlichen Effekt im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Ebenso finden sich keine erheblichen Auffälligkeiten zwischen uninfizierten und infizierten CBL.

Bei einem Vergleich mit der Kurzzeitkinetik (Kapitel 3.2.2) ist zu erkennen, dass die Veränderungen, die in den ersten Stunden deutlich zu sehen sind, sich im Langzeitverlauf mit nur kleinen Unterschieden abbilden. Betrachtet man bei IL-4 jedoch den Kurvenverlauf der Infektion, kann ein Abfall der IL-4 Expression am deutlichsten bei der Stimulation mit α -CD3/ α -CD28 nach 7 Tagen registriert werden. Bei der Stimulation mit TPA/Ionomycin tritt dieser Effekt nicht auf. Unstimuliert erfolgt sogar eine Stabilisierung des Niveaus nach 7 Tagen nach zuvorigem Abfall.

Bei IL-10 stellen sich zwischen den Virusvarianten keine großen Unterschiede in der Langzeitkinetik im Vergleich zur Kurzzeitkinetik dar, jedoch liegt das Niveau der Expression von IL-10 von infizierten Zellen weiter über dem von uninfizierten. Es erfolgt jedoch keine Veränderung im Bezug auf den Infektionsgrad.

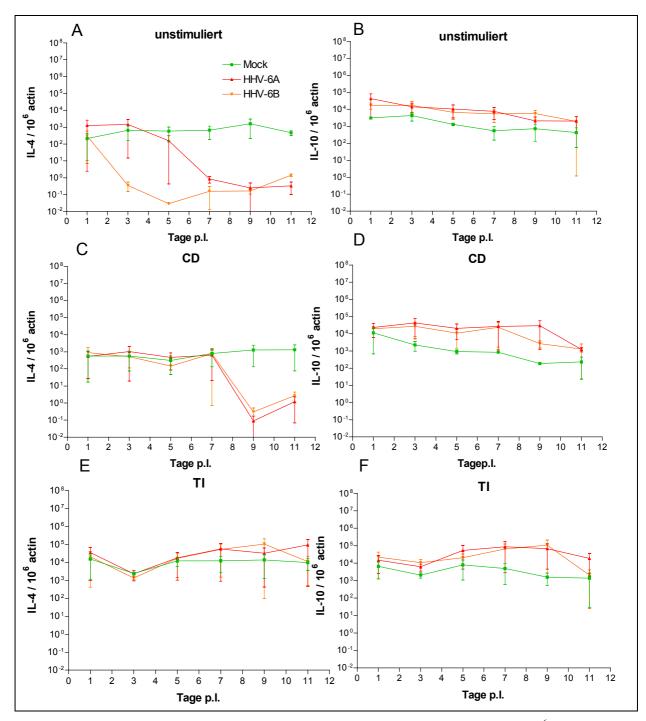


Abbildung 38: Th2-Zytokine infizierter und stimulierter CBL. Infektion von 1 x 10^6 CBL mit 1 ml zellfreiem, virushaltigen Kulturüberstand. Uninfizierte Zellen (Mock), mit HHV-6 Variante A infizierte Zellen (HHV-6A), mit HHV-6 Variante B infizierte Zellen (HHV-6B). Jeweils IL-4 und IL-10 unstimuliert (Abb. A,B), mit α -CD3/ α -CD28 stimuliert (CD) (Abb. C,D) und mit TPA/Ionomycin (TI) stimuliert (Abb. E,F). Mittelwert und Standardabweichung aus 3 Parallelansätzen. Ähnliche Resultate wurden in 3 unabhängigen Versuchen erzielt.

Hämatopoetische Zytokine:

Sowohl die Stimulation mit mitogenen Stimuli, als auch die Stimulation der Oberflächenrezeptoren führt zu einer verstärkten Produktion von GM-CSF, wobei α -CD3/ α - CD28-Stimulation und Stimulation mit TPA/Ionomycin zu einer Erhöhung im Vergleich zu den unstimulierten CBL führt. Dabei verhalten sich die Verläufe der uninfizierten und infizierten CBL nahezu identisch.

Nach der Stimulation mit α -CD3/ α -CD28 kommt es zu einem Anstieg von GM-CSF bis zum siebten Tag in allen CBL, gefolgt von einem stetigen Abfall. Die Stimulation mit TPA/Ionomycin führt vorerst zu einem leichten Abfall bis zum dritten Tag, um dann bis zum neunten Tag anzusteigen. In Bezug auf die Kurzzeitkinetik (Kapitel 3.2.2.) gibt es keine eindeutigen Veränderungen.

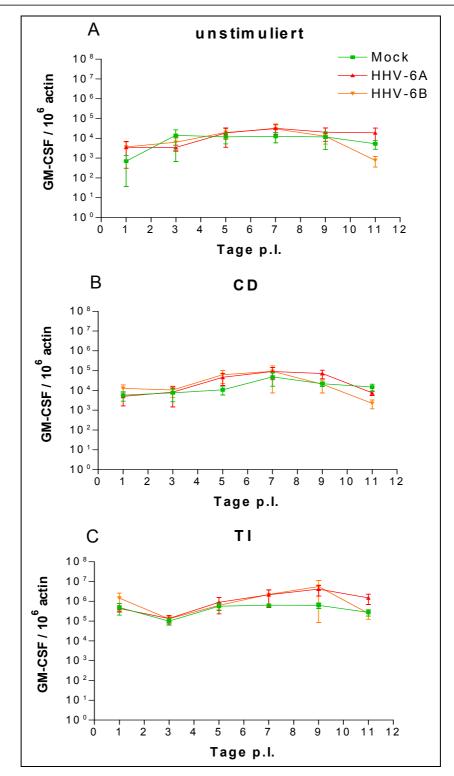


Abbildung 39: Das hämatopoetische Zytokin GM-CSF infizierter und stimulierter CBL. Infektion von 1 x 10 6 CBL mit 1 ml zellfreiem, virushaltigen Kulturüberstand. Uninfizierte Zellen (Mock), mit HHV-6 Variante A infizierte Zellen (HHV-6A), mit HHV-6 Variante B infizierte Zellen (HHV-6B). GM-CSF unstimuliert (Abb. A), mit α -CD3/ α -CD28 (CD) stimuliert (Abb. B) und mit TPA/Ionomycin (TI) stimuliert (Abb. C). Mittelwert und Standardabweichung aus 3 Parallelansätzen Ähnliche Resultate wurden in 3 unabhängigen Versuchen erzielt.

Ergebnisse

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit HHV-6A in den ersten Stunden zu einer verstärkten Expression der gemessenen Zytokine führt, nur IL-2 wurde vermindert exprimiert. Über einen längeren Beobachtungszeitraum gab es keine eindeutigen Veränderungen. HHV-6B erbrachte nur eine kurzzeitig erhöhte Expression bei IFN-γ. Durch Stimulation rief nur die Kombination von TPA/Ionomycin eine vermehrte Expression der Zytokine hervor, wobei dies unabhängig von der Infektion war.

Auch konnte keine direkte Korrelation zum Infektionsgrad der Zellen gefunden werden. Nur bei IL-4 traten nach dem siebten Tag Veränderungen auf.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden zunächst die Unterschiede der Lymphozytenpopulationen in Nabelschnurblut und adultem Blut mittels Durchflusszytometrie herausgestellt. Ausgehend von der Annahme, dass die Unterschiede der Lymphozytenpopulationen durch eine verschiedenartige Zytokinregulation erfolgt, schloss sich die Analyse der Zytokinmuster von CBL und PBL mittels rt-PCR und ELISA an. Da viele Zytokine erst nach Stimulation gebildet werden, kam zusätzlich eine Stimulationen mit mitogenen und Oberflächenrezeptor stimulierenden Substanzen hinzu. Nachfolgend fand die Untersuchung der für die einzelnen Zytokine spezifischen Transkriptionsfaktoren statt, um den Einfluss auf die Regulation der Zytokinexpression zu beurteilen.

Darüber hinaus wurde der Frage nachgegangen, ob eine Infektion mit HHV-6 das Zytokinmuster in CBL und PBL verändert und somit Einfluss auf eine GVHD nach KMT haben könnte. Hierzu erfolgte die Analyse der Zytokin mRNA mittels rt-PCR.

4.1 Vergleich Nabelschnurblut vs. peripheres Blut

4.1.1 Vergleich der Lymphozytenpopulationen in peripherem Blut und Nabelschnurblut mittels FACS

In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie als Methode zur Charakterisierung der Lymphozytenpopulationen gewählt. Hierbei besteht die Möglichkeit die Zellen nach Größe und Granularität in Populationen zu unterteilen und sie zusätzlich mittels monoklonaler Antikörper in spezifische Subgruppen zu unterteilen.

Leukozyten setzten sich aus verschiedenen Subpopulationen zusammen. Hierzu gehören: Neurophile Granulozyten 55-70%, Eosinophile Granulozyten 2-5%, Basophile Granulozyten <1%, Lymphozyten 25-40% und Monozyten/Makrophagen 5-8%.

Da in dieser Arbeit die Unterschiede von PBL und CBL herausgearbeitet werden sollten, waren die Lymphozyten und deren Subpopulationen von Interesse, da hieraus eine Zuordnung zu z.B. reifen (CD45Ra) und naiven (CD45Ro) Zellen gemacht werden kann. Hierzu wurden die einzelnen Lymphozytenpopulationen durch entsprechende Oberflächenmarker (CD) mittels Durchflusszytometrie sichtbar gemacht.

Es erfolgte die Bearbeitung mit Nabelschnurblut und peripherem Blut, das zur weiteren Kultivierung mit Ficoll aufbereitet war, um die mononukleären Zellen zu separieren. Hierbei kam es zusätzlich zu einem Vergleich mit demselben Blut nach Erylyse.

Darüber hinaus wurde zu der Färbung mit den entsprechenden Oberflächenmarker-Antikörpern jeweils ein weiterer Antikörper (Pan-Leukozyten-Antikörper = CD45) gefärbt, der auf allen kernhaltigen Zellen des hämatopoetischen System exprimiert wird.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich in einer nach Größe und Granularität gelegten Lymphozyteneingrenzung Zellen befinden, die zwar der Größe und Granularität von Lymphozyten entsprechen, jedoch nicht den Oberflächenmarker CD45 tragen (vgl. Ergebnisteil Abb. 8).

Ridings et al. haben diese Zellen in ausführlichen FACS-Analysen als unreife rote Blutzellen gedeutet, die CD45 negativ sind, jedoch in Größe und Granularität Lymphozyten entsprechen (Ridings et al., 1996). Diese Kontamination mit roten Blutzellen kann makroskopisch in der Interphase nach Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation bei CBL gesehen werden, nicht aber bei PBL. Daraus lässt sich schließen, dass unreife rote Blutzellen eine Dichte größer als 1,077 haben, aber andere Sedimentationseigenschaften als reife rote Blutzellen besitzen.

Die Lymphozyten, die nach Größe und Granularität ausgewählt wurden, haben in CBL einen geringfügig höheren Anteil als in PBL (Median: VB PBL 28,91%; VB CBL 32,15%). Dabei ist der Anteil bei einer Anreicherung mit Ficoll in CBL deutlich höher als in PBL (Median: Ficoll PBL 38,93%, CBL 63,2%). Erfolgte die Betrachtung der CD45⁺ Lymphozyten, zeigte sich in PBL ein ähnlicher Median wie ohne CD 45 (Median: PBL Ficoll/CD45 41,69%, PBL VB/CD45 28,91%). Bei CBL waren die Unterschiede etwas größer (Median: CBL Ficoll/CD45 52,72%, CBL VB/CD45 38,79%).

CD4⁺-T-Lymphozyten gelten funktionell in der Regel als Helferzellen und besitzen einen Rezeptor, welcher Antigene im Kontext von MHC-Klasse-II-Molekülen erkennt.

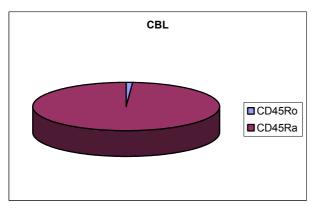
Bei den CD4⁺ Zellen stimmen die Daten aus Vollblut nach Erylyse mit denen der Literatur überein (Median: VB PBL 46,41%; VB CBL 34,81%) (D'Arena et al., 1998; Rabian-Herzog et al., 1992), wobei der Unterschied zwischen PBL und CBL in dieser Arbeit größer ist als bei D'Arena, der annähernd gleiche Werte für PBL und CBL zeigte. Bei mit Ficoll aufbereiteten Zellen findet sich erneut, insbesondere bei CBL, ein großer Unterschied zum Vollblut nach Erylyse (Median CBL Ficoll 14,42%). Bei PBL ist der Unterschied nicht ganz so groß (Median PBL Ficoll 31,59%). Die Betrachtung von CD45⁺ Lymphozyten führt wiederum zu Ergebnissen, die dem Vollblut nach Erylyse sowohl bei PBL als auch bei CBL nahe kommen (Median: PBL

Ficoll/CD45 49,96%, PBL VB/CD45 48,73%; CBL Ficoll/CD45 42,01%, CBL VB/CD45 44,13%).

CD3⁺ Zellen sind für die Erkennung des Antigens und eine Aktivierung der T-Zelle verantwortlich. Durch CD28⁺ Zellen erfolgt eine Kostimulation in Verbindung mit CD3, die T-Zellen zur Proliferation und zur Zytokinproduktion anregt.

Die Messung der CD3⁺ Zellen zeigt im Vollblut nach Erylyse in PBL einen höheren Anteil als in CBL (Median: VB PBL 49,26%; VB CBL 15,3 1%). Betrachtet man nun im Vergleich hierzu die Werte mit Ficoll, sieht man insbesondere bei CBL eine Verringerung der CD3⁺ Zellen um die Hälfte im Vergleich zum Vollblut nach Erylyse (Median CBL Ficoll 15,31%). In PBL ist der Wert um nahezu 20% geringer (Median PBL Ficoll 49,26%). Die Betrachtung von CD45⁺ Lymphozyten führt wiederum zu abweichenden Ergebnissen (Median: PBL Ficoll/CD45 80,74%, PBL VB/CD45 77,10%; CBL Ficoll/CD45 49,74%, CBL VB/CD45 63,07%). Die Werte von CD3⁺/CD28⁺ entsprechen nahezu den Prozentangaben von CD3⁺.

CD45⁺-Zellen sind eine Voraussetzung für T- und B-Zell Antigen Rezeptor vermittelte Aktivierung. CD45Ra wird auf Oberflächen von naiven T-Zellen exprimiert, CD45Ro wird auf Oberflächen von Gedächtnis-T-Zellen exprimiert. CD45Ro ersetzt CD45Ra auf der Zelloberfläche als Resultat einer Antigenexposition (D'Arena et al., 1998). Der Anteil an CD45Ra⁺ Zellen ist in CBL höher als in PBL (Median: VB PBL 55,22%, VB CBL 74,35%). In mit Ficoll aufbereiteten CBL finden sich hingegen signifikant weniger CD45Ra⁺ Zellen als bei PBL (Median: PBL Ficoll 47,98%, CBL Ficoll 25,21%). Betrachtet man die Verteilung im Vollblut nach Erylyse bzw. in den zusätzlich nach CD45 eingegrenzten Zellen, liegt der Anteil der CD45Ra⁺ Zellen in CBL jeweils signifikant über dem Anteil in PBL. Die Unterschiede zeigen sich deutlicher in CBL als in PBL (Median: PBL Ficoll/CD45 66,04%, PBL VB/CD45 68,16%; CBL Ficoll/CD45 97,39%, CBL VB/CD45 99,10%).



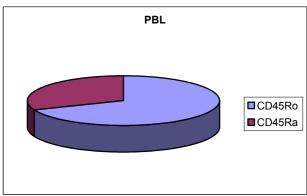


Abbildung 40: Verteilung von CD 45Ra und CD45Ro in CBL und PBL Jeweils in Vollblut/CD45 prozentual ausgewertet.

Der Anteil der CD45Ro⁺ Zellen war in PBL signifikant höher als in CBL (Median: VB PBL 22,3%; VB CBL 0,03%). Dies entspricht auch den Ergebnissen der Literatur (Cohen et al., 1999; D'Arena et al., 1998; Mills et al., 1996; Beck and Lam-Po-Tang, 1994).

Auch in PBL finden sich CD45Ra⁺ Zellen, jedoch ist nicht ausreichend geklärt, ob diese Zellen genauso naiv sind wie CD45Ra⁺ Zellen in CBL. Hassan und Reen beschreiben, dass sich CD45Ra⁺ Populationen in CBL und PBL in ihrer Zytokinproduktion unterscheiden. Dabei würden naive CD45Ra⁺ Zellen nach Stimulation kein IL-2 produzieren, adulte CD45Ra⁺ Zellen hingegen schon (Hassan and Reen, 1997).

Bei der Messung der CD45Ro⁺ Zellen zeigten sich keine so deutlichen Unterschiede im Vergleich der verschiedenen Messmethoden. Dabei lagen die mit Ficoll aufbereiteten Zellen etwa 10% unter den Messwerten der anderen Versuchsanordnungen.

Insgesamt fand sich in den Versuchen, dass durch Ficoll in CBL bei den Lymphozyten und deren Subpopulationen andere Ergebnisse gefunden werden konnten als in PBL. Dabei zeigte sich, dass die größten Unterschiede entstehen, wenn man die mit Ficoll aufbereiteten Zellen ohne zusätzliche CD45 Färbung betrachtet. Dies ist am ehesten auf die oben genannte Kontamination durch unreife rote Blutkörperchen der Interphase bei Bearbeitung von CBL zurückzuführen (Ridings et al., 1996). Diese Unterschiede von Vollblut nach Erylse und mit Ficoll bearbeitetem Blut sind ähnlich in der Literatur beschrieben worden (Beck and Lam-Po-Tang, 1994).

Darüber hinaus stellen Schwellenfluoreszenz-, Detektoren- und Quadranteneinstellungen bei der Auswertung Variablen dar, die von dieser Arbeit zu anderen Arbeiten verschieden sein kann, so dass die Vergleichbarkeit mit anderen Studien eingeschränkt ist.

Langjährige Erfahrungen weisen die Methodik der Anreicherung durch Ficoll als besonders schonend für die Zellen des Nabelschnurblutes aus. Es konnte gezeigt werden, dass mit Ficoll angereicherte CBL am besten mit jenen Zellschutzsubstanzen (Medium RPMI, humanes Serumalbumin sowie 10%iges DMSO) versetzt werden können, welche in dieser Zusammensetzung auch in Nabelschnurblutbanken seit vielen Jahren Verwendung finden (Meyer et al., 2006). Um den Bezug zur klinischen Relevanz zu bekommen, erfolgten daher die weiteren Versuche nicht mit Vollblut nach Erylyse, sondern mit Ficoll angereicherten Zellen.

In der Literatur finden sich im Allgemeinen keine Unterschiede im Vorkommen von B-Lymphozyten beschrieben, weshalb auch in dieser Arbeit nicht näher darauf eingegangen wurde.

4.1.2 Einfluss der Lymphozytenpopulation auf die Zytokinproduktion

Reife CD4⁺ Th-Lymphozyten werden in zwei funktionelle Untergruppen eingeteilt, Th1 und Th2, basierend auf den Zytokinmustern, die sie nach Aktivierung exprimieren (Abbas et al., 1996). Darüber hinaus gibt es noch hämatopoetische Zellen, die ihrerseits ebenfalls spezielle Zytokinmuster aufweisen. Erste Arbeiten an murinen T-Zell Klonen ergaben, dass Th1-Zellen IL-2 und IFN-γ exprimieren, wohingegen Th2-Zellen IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 exprimieren (Mosmann and Fong, 1989). Auch in humanen T-Zell Klonen wurden diese zwei Untergruppen bereits beschrieben (Romagnani, 1991).

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte ein Vergleich der Zytokinexpression anhand von mRNA mittels rt-PCR sowie der Zytokinproduktion mittels ELISA von PBL und CBL 6 Stunden nach Stimulation mit α -CD3, α -CD28, TPA, Ionomycin und Kombinationen aus diesen. Um eine Vergleichbarkeit mit anderen Versuchen herbeizuführen, ist die Abhängigkeit der Zytokinproduktion von Art und Menge des Stimulus und der Dauer der Inkubation zu berücksichtigen. Für die Zytokinproduktion ist außerdem die Umgebung der Zellen relevant. Hier spielen Zellgemisch, Zellzahl, Kulturmedium, technische Inkubationsbedingungen und nicht zuletzt das Zytokinmilieu eine wichtige Rolle.

Mittels ELISA sind quantitative Aussagen über die Zytokinproduktion möglich, jedoch nicht über den zytokinproduzierenden Zelltyp. Auf diese Weise können zum Beispiel IFN-γ produzierende Monozyten, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen die Ergebnisse verfälschen, zumal TPA und Ionomycin keine T-Zell-spezifischen Stimuli sind.

Die vorliegende Arbeit konnte veranschaulichen, dass in PBL und CBL die Produktion von IL-2 vergleichbar ist. Nur diese Stimulation mit TPA oder das Vorhandensein von α -CD3 als

Stimulus induzierte mehr IL-2 in PBL als in CBL. Im Gegensatz dazu wurde unabhängig vom Stimulus deutlich weniger IFN-γ in CBL als in PBL induziert. Auch die Umgehung des T-Zell-Rezeptors durch direkte mitogene Stimulation konnte kein vergleichbares Niveau von IFN-γ in CBL erzeugen.

Wie bereits erwähnt, kann Nabelschnurblut durch optimale Stimulation ähnliche Zytokinniveaus erreichen wie adultes Blut (Kesson and Bryson, 1991). α-CD3/α-CD28 Stimulation von CD4⁺CD45⁺ PBL erhöht das Niveau der IL-2 mRNA zu einem höheren Grade als CD4⁺CD45⁺ von CBL. Dieser Unterschied lässt sich durch zusätzliche Stimulation von naiven Zellen in CBL mit TPA beseitigen (Hassan and Reen, 1997). Dies zeigt, dass naive Zellen in CBL einige Zytokine vermindert produzieren, dieses sich aber durch optimale Stimulation deutlich verändern lässt, so dass ein ähnliches Niveau in CBL und PBL erreicht werden kann.

Die Stimulation mit α -CD3 und α -CD28 als Oberflächenrezeptor stimulierenden Substanzen spiegelt insbesondere in der Proteinmenge im Überstand die Unterschiede zwischen CBL und PBL wider, die auch schon in Kapitel 3.1.1. dargestellt wurden. Hierbei fanden sich mehr als doppelt so viele PBL, bei denen die Oberflächenrezeptoren CD3 und/oder CD28 nachzuweisen waren als bei CBL. Diese Differenz zeigte sich im Stimulivergleich insbesondere im Protein-Niveau bei allen gemessenen Zytokinen, was bedeuten kann, dass die vermehrte Produktion der Zytokine mit der vermehrten Expresssion des entsprechenden Rezeptors zusammenhängt.

Die einzelnen Th2-Zytokine brauchen unterschiedliche Stimulationsbedingungen für eine optimale Induktion. Nur bei Vorhandensein von Ionomycin wurde IL-4 wirksam induziert. Die Wichtigkeit dieses Stimulus für IL-4 wurde auch von Paliogianni gezeigt (Paliogianni et al., 1996).

Die Produktion von IL-5 wurde nur in Gegenwart einer Kombination von zwei Stimuli induziert. IL-4 und IL-5 waren in CBL mit den meisten Stimuli nicht detektierbar. Im Gegensatz dazu erreichte IL-13 ein vergleichbares Niveau in CBL im Vergleich zu PBL, wenn ein mitogener Stimulus vorhanden war.

Es wurde beschrieben, dass in neonatalen Zellen mehr Th2-Zellen als Th1-Zellen zu finden sind (Adkins, 2000; Prescott et al., 1998). In dieser Arbeit wurde eine reduzierte Expression von Th1- und Th2-spezifischen Zytokinen in CBL beobachtet. Andere Studien führten intrazelluläre Färbungen der Zytokine durch, um Unterschiede zwischen PBL und CBL zu zeigen, dabei wurde auch TPA/Ionomycin als Stimulus verwendet (Chalmers et al., 1998; Krampera et al., 2000). In Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen wurden gleiche Niveaus von

intrazellulärem IL-2 und niedrigere Niveaus von IFN-γ und IL-4 in CBL gefunden. Auch in anderen Veröffentlichungen konnte dargestellt werden, dass es zu einer verminderten Expression von Th1-spezifischen Zytokinen in CBL kommt (Chipeta et al., 1999; Cohen and Madrigal, 1998; Cohen et al., 1999; Gardiner et al., 1998). Weiterhin wurde beschrieben, dass nur eine schwache Antwort von IFN-γ in CBL verglichen mit PBL zu finden ist (Han and Hodge, 1999; Kilpatrick et al., 2004). Des Weiteren beschreibt die Literatur, dass die Expression von IFN-γ, IL-4, GM-CSF unabhängig von der Stimulationsmethode niedriger in CBL als in PBL ist (Cairo et al., 1991; Lewis et al., 1991; Sautois et al., 1997).

Das Ungleichgewicht der Th-Zell-Untergruppen kann nicht ausschließlich durch das Niveau der Zytokinproduktion beschrieben werden. Die IL-3 Expression war in PBL unabhängig vom Stimulus stärker als in CBL. Interessanterweise erreichte das produzierte GM-CSF ein etwa gleiches Niveau in PBL und CBL bei Vorhandensein der meisten verwendeten Stimuli. Die Stimulation der Oberflächenrezeptoren blieb unwirksam, mitogene Stimulation hingegen induzierte dieses Zytokin wirksam.

Obwohl weder ein präziser Mechanismus noch ein physiologischer Einfluss von IL-3 in frühen hämatopoetischen Prozessen bekannt ist, existieren doch Nachweise, die nahe legen, dass die Präsenz von IL-3 T- und B-Zell assoziierte lymphopoetische Vorgänge inhibiert und zu einer Verminderung des Auftretens einer GVHD führen könnte (Miyamoto et al., 2001). In dieser Arbeit wurde jedoch eine verminderte Produktion von IL-3 in CBL beobachtet.

Es existieren aber *in vivo* und *in vitro* Nachweise, die unterstreichen, dass Proliferation und Differenzierung durch IL-3 beeinflusst sind, vereinbar mit einem reduzierten Potential der Repopulation von Stammzellen. In diesem Zusammenhang wäre eine erniedrigte Produktion von IL-3 von Vorteil für Stammzellverpflanzung und Knochenmarkrepopulation in Patienten, denen CB transplantiert wurde.

4.1.3 Kinetik der Zytokininduktion

Da die ersten Versuchsreihen nur jeweils einen Zeitpunkt abbildeten, sollte durch eine Kinetik herausgefunden werden, ob die Fähigkeiten zur Zytokinproduktion in CBL und PBL im Zeitverlauf weitere Auffälligkeiten zeigen.

Es konnte veranschaulicht werden, dass für alle Zytokine ein rascher Anstieg in den ersten 6 Stunden zu beobachten war, der auf einem relativ konstanten Niveau bei Th1- und hämatopoetischen Zytokinen (IL-2, IFN-γ, IL-3, GM-CSF) verblieb. Die Th2-Zytokine (IL-4, IL-5, IL-13) fielen innerhalb von 4 Tagen wieder langsam ab.

Dennoch war über den gesamten Beobachtungszeitraum das mRNA Niveau bei allen Zytokinen in CBL etwa 10fach niedriger als in PBL. Die einzige Ausnahme bildete IL-3, welches sich nach 12 Stunden an das Expressionsniveau von PBL angenähert hatte. Chalmers et al. haben einen Zeitverlauf von IL-2, IL4 und IFN-γ produzierenden Zellen über 24 Stunden mittels Durchflusszytometrie beobachtet. Dabei wurden gleiche Mengen von IL-2 produzierenden Zellen in PBL und CBL gefunden, aber kleinere Mengen von IL-4 and IFN-γ produzierenden Zellen in CBL verglichen mit PBL (Chalmers et al., 1998).

4.1.4 Regulation der Zytokinproduktion durch Transkriptionsfaktoren

Die verminderte Zytokinproduktion von neonatalen Zellen könnte mit einer verminderten Transkription von zytokinspezifischen Genen und mRNA Akkumulation zusammenhängen (Lewis et al., 1991).

Daher erfolgte die Untersuchung, ob die Unterschiede der Zytokinexpression von PBL und CBL durch eine mangelnde Expression oder fehlende Aktivierung von Transkriptionsfaktoren herbeigeführt wird. Es konnte veranschaulicht werden, dass eine generell niedrigere Zytokinsynthese zumindest teilweise durch eine verminderte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB hervorgerufen wird. Dieser Transkriptionsfaktor ist für die Aktivierung einer Reihe von T-Zell Zytokinen verantwortlich, wie IL-2, IL-4, IFN-γ, IL-3 und GM-CSF (Ruhlmann and Nordheim, 1997).

Auch stellte sich dar, dass die Expression des Proteins NF-AT1 in nicht stimulierten CBL verglichen mit PBL signifikant erniedrigt ist und erst teilweise exprimiert wird, wenn eine längere Stimulation des T-Zell-Rezeptors erfolgt (Kadereit et al., 1999).

Im Verlauf fand die Auswertung der einzelnen, für die Th-Untergruppen spezifischen Transkriptionsfaktoren statt.

T-bet wurde bereits als Th1-induzierender Transkriptionsfaktor beschrieben, welcher die Expression von IFN-γ aktiviert (Agnello et al., 2003; Szabo et al., 2000). Dies kam in der vorliegenden Arbeit auch durch die signifikante Korrelation zwischen T-bet und IFN-γ im zeitlichen Verlauf zur Darstellung.

c-maf ist für die Expression des Th2-spezifischen Zytokins IL-4 verantwortlich (Agnello et al., 2003; Ho et al., 1996). Es wurde eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von c-maf und IL-4 gefunden, jedoch keine Korrelation zwischen c-maf und IFN-γ, was die Aussage

unterstützt, dass c-maf ein für Th2-Zellen spezifischer Transkriptionsfaktor ist, nicht aber von Th1-Zellen.

Die Expression eines anderen Th2-spezifischen Transkriptionsfaktors, GATA-3, scheint nicht in irgendeiner Form reguliert zu werden.

Ferner erfolgte die Untersuchung, ob die Expression dieser Th-Untergruppen spezifischen Transkriptionsfaktoren von verschiedenen Stimuli reguliert wird.

TPA/Ionomycin führte zu einem starken Anstieg des Th1-spezifischen Transkriptionsfaktors T-bet. Des Weiteren war in PBL ein höheres Niveau von T-bet zu beobachten als in CBL. Nur mitogene Stimuli konnten ein ähnliches Niveau in CBL induzieren.

Der Th2-spezifische Transkriptionsfaktor c-maf war durch Ionomycin zu regulieren. Dieser Stimulus wirkte nur in PBL, was nahe legt, dass ein spezifischer Defekt im Signalweg des Kalziums in CBL vorhanden sein muss, was wiederum für die niedrigere Expression von Th2-Zytokinen verantwortlich sein könnte. Die Fähigkeit des Ionomycins zur Stimulation von IL-4 wurde schon zuvor beschrieben (Paliogianni et al., 1996).

Wird die Expression aller Transkriptionsfaktoren über eine gewisse Zeit nach Stimulation mit TPA und Ionomycin beobachtet, offenbaren sich bemerkenswerte Unterschiede. Die Expression von T-bet war in PBL und CBL nahezu gleich mit einem Anstieg in den ersten 6 Stunden und einem Abfall nach 24 Stunden. Im Gegensatz dazu ließen sich c-maf und GATA-3 nur in PBL induzieren, in CBL blieb das Expressionsniveau nahezu konstant. Diese Beobachtungen stimmen mit Ergebnissen der Versuche über die Zytokinproduktion überein, bei denen das Niveau der Th2-spezifischen Zytokine stärker erniedrigt war, als das der Th1-spezifischen Zytokine in stimulierten CBL verglichen mit PBL.

Somit ist die unterschiedliche Fähigkeit von PBL und CBL zur Zytokinproduktion wahrscheinlich auf eine verminderte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zurückzuführen. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB war höher in PBL als in CBL. Auch die Expression der Th-Untergruppen spezifischen Transkriptionsfaktoren, T-bet und c-maf, war in PBL höher als in CBL.

Dabei zeigen die Zeitverläufe, dass die Expression von T-bet sich über einen längeren Verlauf in PBL und CBL nahezu angleicht, wobei die Expression von c-maf und GATA-3 in CBL etwa 10fach niedriger liegt als in PBL.

4.1.5 Einfluss der Zytokinproduktion auf die GVHD

GVHD ist eine bedeutende Komplikation der allogenen Zelltransplantation. Es existieren Nachweise, dass die GVHD in enger Beziehung zu einer bestimmten Zytokinproduktion steht: Ein Anstieg der Inzidenz und der Ausprägung bzw. des Schweregrades der GVHD ist mit den pro-inflammatorischen Th1-Zytokinen assoziiert, während anti-inflammatorische Th2-Zytokine die GVHD reduzieren können (Dickinson et al., 1994; Krenger et al., 1996).

Kurtzberg und Gluckman (Eurocord) haben Daten erhoben, in denen die Transplantation von Nabelschnurblut zu einer niedrigeren Inzidenz einer GVHD im Vergleich zu Knochenmarktransplantaten führt (Gluckman et al., 1997; Kurtzberg et al., 1996). Verschiedenste Ansätze machen deutlich, dass dies eine Eigenschaft der Spenderzellen ist und weniger eine Antwort des Empfängers (Rocha et al., 2000).

Auch andere Autoren beobachteten beim Vergleich zwischen adultem Blut und Nabelschnurblut Unterschiede in der Genexpression und der Produktion der Zytokine, ebenso wie dem Auftreten von Zytokin produzierenden Zellen. Die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine von T-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen sind in Nabelschnurblut im Vergleich zu adultem Blut vermindert (Cohen et al., 2000). Darüber hinaus ist bei Nabelschnurblut das Ansprechen auf Zytokine wegen der verminderten Expression von vielen Zytokinrezeptoren reduziert. Dies impliziert, dass Nabelschnurblut keine ausgeprägte Zytokinausschüttung auslösen kann. Andererseits wurde auch schon von Patienten berichtet, die nach Nabelschnurbluttransplantation eine schwere GVHD entwickelt haben (Kogler et al., 1999). Neuere Daten weisen jedoch darauf hin, dass bei diesen Patienten vermutlich eine genetische Prädisposition zur Entwicklung der Erkrankung vorlag, da ein TNF und IL-10 Polymorphismus im Wirt mit dem Auftreten und der Schwere der GVHD auf Grund von 1-4 HLA Antigen Ungleichgewichten der Nabelschnurbluttransplantate korrelierte (Kogler et al., 2002).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Nabelschnurblutzellen eine verminderte Fähigkeit haben Zytokine zu produzieren und auf diese zu reagieren, weshalb keine inflammatorische Immunantwort aufrechterhalten werden kann. Dies könnte die verminderte Inzidenz und Schwere einer GVHD bei Nabelschnurbluttransplantaten erklären. Die Fälle von schwerer GVHD in Verbindung mit Nabelschnurbluttransplantationen, könnten in Zusammenhang mit der zuvor genannten genetischen Prädisposition stehen.

4.2 Einfluss von HHV-6 auf die Zytokinproduktion

Es ist mittlerweile allgemein bekannt, dass die zellvermittelte Immunität gegen infektiöse Bestandteile von Bakterien, Protozoen und Pilzen von zwei bestimmten T-Zell vermittelten Zytokinregimes reguliert wird. Die Produktion von Th1-Zytokinen, wie IL-2 und IFN-γ ist im allgemeinen mit der Resistenz gegen Infektionen assoziiert. Th2-Zytokine, wie IL-4 und IL-10, sind mit dem Fortschreiten der Erkrankung assoziiert (D'Arena et al., 1999). Auch in der antiviralen Abwehr spielt die Zytokinregulation eine wichtige Rolle. IL-12 induziert selektiv die Th1-Zytokine, während IL-10 als Th2-Zytokin einen Rückgang der Typ 1 Antwort erzeugt (Moore et al., 1993; Trinchieri, 1997).

Hieraus entstand die Frage, ob eine Infektion mit HHV-6, als häufiges Virus im Rahmen einer Reaktivierung nach KMT, das Zytokinmuster in CBL und PBL verändert und somit Einfluss auf eine GVHD haben kann. Um dies zu untersuchen, war zunächst zu klären, nach wie vielen Tagen eine Infektion mit HHV-6 der Varianten A und B im IFA sichtbar gemacht werden kann.

4.2.1 Nachweismethoden von HHV-6

Der Nachweis viraler Antigene in Blutzellen gilt als Hinweis auf eine aktive Vermehrung der Viren in den untersuchten Zellen (Hebart et al., 1996; Schmidt et al., 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 den Blutzellen wurden in dieser Arbeit monoklonale Antikörper verwendet. Als Detektionsmethode der monoklonalen Antikörper diente der Nachweis über Fluoreszenzfarbstoff markierte Sekundärantikörper mittels IFA.

Es erfolgte eine *in vitro* Infektion von mit Ficoll aufbereiteten CBL mit zellfreiem infiziertem Kulturüberstand, wie unter 2.1.5.5 beschrieben.

Erst nach sieben Tagen konnte eine Infektion von CBL im IFA-Präparat mit dem Mikroskop sichtbar gemacht werden. Dabei zeigte sich, dass bis zum 13. Tag eine Infektion mit HHV-6A zu ca. 25% infizierten Zellen führte. Die Infektion mit HHV-6B verursachte eine Infektion von ca. 20% der Zellen. Betrachtet man dies im Zusammenhang mit den toten Zellen, die jeweils gezählt wurden, so ist zu erkennen, dass sich in den Präparaten mit HHV-6A deutlich mehr tote Zellen befinden als in den Präparaten mit HHV-6B.

Im weiteren Verlauf sollte geklärt werden, ob HHV-6 der Varianten A und B einen stimulierenden Effekt auf die Expression von einzelnen Zytokinen haben und somit die GVHD beeinflussen könnten.

4.2.2 HHV-6 als möglicher Stimulus der Zytokinproduktion

Da eine Infektion mit HHV-6 zu einer Veränderung der Zytokinproduktion führen könnte, wurden CBL mit zellfreiem infizierten Kulturüberstand infiziert. Vorerst erfolgte die Infektion von CBL ohne Stimulation. In der Kurzzeitkinetik über 48 Stunden zeigte sich in dieser Arbeit eine deutlich niedrigere Expression von IL-2 in infizierten Zellen im Vergleich zu den uninfizierten Zellen. Dies galt sowohl für HHV-6A als auch für HHV-6B.

In der Literatur wird beschrieben, dass die Infektion von PB-MNC mit HHV-6 zu einer Suppression der T-Zell-Funktionen, einschließlich reduzierter IL-2 Synthese und Zellproliferation führt (Krueger and Ablashi, 2003).

Für das zweite Th1-spezifische Zytokin IFN-γ ist eine erniedrigte Expression bei HHV-6A nur in den ersten 4 Stunden zu beobachten. Bei HHV-6B zeigte sich die erniedrige Expression nur in der ersten Stunde und dann wieder nach 6 Stunden.

Smith et al. konnten eine Verminderung von IL-12 durch HHV-6 nachweisen, was mit der Vermutung konform geht, dass HHV-6 fähig ist, eine Immunsuppression durch Inhibition der Th1-Zytokin spezifischen Immunantwort herbeizuführen (Smith et al., 2003). Im Gegensatz dazu fand Mayne eine erhöhte Expression von Th1-spezifischen Zytokinen in mit HHV-6 infizierten Zellen (Mayne et al., 2001). Darüber hinaus ließ sich beobachten, dass eine Infektion *in vitro* die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IFN-γ, TNF-α und IL-1β induziert (Flamand et al., 1998). Auch wurde demonstriert, dass HHV-6 selektiv die Synthese von TNF-α, IL-1β und IL-6 in PB-MNC reguliert (Arena et al., 1999). Im Gegensatz dazu zeigte Flamand, dass die Infektion von PB-MNC mit HHV-6 nicht zu einer Induktion von IL-6 führt (Flamand et al., 1991).

Somit wird der Einfluss von HHV-6 auf eine mögliche Immunsuppression trotz gleicher Methodenwahl kontrovers diskutiert. Diese Arbeit stützt jedoch die Annahme, dass eine proinfammotorische Reaktion reduziert wird und daraus eine verminderte GVHD resultieren könnte.

Bei den Th2-spezifischen Zytokinen IL-4 und IL-10 und auch bei dem hämatopoetischen Zytokin GM-CSF zeigte sich eine gesteigerte Expression der Zytokine nach Infektion mit HHV-6. Dabei war der Effekt immer deutlicher bei einer Infektion mit HHV-6A als mit HHV-6B zu

beobachten. Der Literatur nach kann das Virus die IL-10 und IL-12 Expression in Makrophagen und Monozyten stimulieren (Li et al., 1997).

HHV-6 ist zum einen fähig, ein hohes Niveau von IL-10 zu erzeugen und aufrecht zu erhalten, zum anderen vermindert es die Freisetzung von IL-12 und hemmt die Produktion von IFN-γ (Arena et al., 1999).

Für IL-10 fanden sich Versuchsergebnisse, die sich mit der Literatur decken, jedoch zeigten sich für IFN-γ sowohl in der Langzeitkinetik, als auch in der Kurzzeitkinetik im Vergleich zu den uninfizierten Zellen eine gesteigerte Expression. Lediglich in den ersten Stunden war eine verminderte Expression zu beobachten. Arena et al. stellten die Hypothese auf, dass HHV-6 die Immunantwort des Wirtes umgeht, indem es IL-10 induziert und damit die Freisetzung von antiviralen Zytokinen, wie IFN-γ und IL-12 aus infizierten Zellen beeinträchtigt, was zu einem "Shift" von Th1 zu Th2 führen kann (Arena et al., 1999).

4.2.3 Zytokinexpression in Langzeitkinetik mit HHV-6 Infektion und Stimulation

Da ohne Infektion ein unterschiedlicher Einfluss verschiedener Stimuli auf CBL und PBL und deren Zytokinproduktion gezeigt werden konnte, wurde in dieser Arbeit im Verlauf zusätzlich zur Infektion mit HHV-6A und HHV-6B eine zeitgleiche Stimulation mit mitogenen (TPA und Ionomycin) und Oberflächenrezeptor stimulierenden Antikörpern (α -CD3 und α -CD28) in verschiedenen Kombinationen durchgeführt.

Unabhängig von der Art der Stimulation waren die Zeitverläufe bei IL-2 etwa gleich. Die in der Kurzzeitkinetik dargestellte erniedrigte Expression bei Infektion mit HHV-6A und HHV-6B konnte nicht eindeutig bestätigt werden.

In PBL wurde beobachtet, dass die Infektion mit HHV-6 zu einer verminderten Expression von IL-2 mRNA nach mitogener Stimulation führt (Flamand et al., 1995).

Für IFN-γ fand sich ebenso kein eindeutiger Einfluss der unterschiedlichen Stimulationen. Es bestand unabhängig vom Stimulus weiterhin eine erhöhte Expression bei Infektion mit HHV-6A und HHV-6B.

Der deutlichste Effekt, der durch die Stimuli hervorgerufen wurde, stellte sich bei IL-4 dar. Insbesondere die mitogene Stimulation führte bei den infizierten CBL zu einer gesteigerten Expression von IL-4. Bei der Stimulation der Oberflächenrezeptoren ließ sich dieser Effekt nur bis zum siebten Tag beobachten.

In der Literatur wird kein zeitlicher Verlauf, sondern jeweils nur ein bestimmter Zeitpunkt betrachtet, zumeist Tag 5-7 p.I., da dies als Gipfel des zytopathischen (CPE) Effekts bewertet wurde (Wang et al., 2006; Yasukawa et al., 1999). In dem in dieser Arbeit gezeigten zeitlichen Verlauf kann veranschaulicht werden, dass bei der Betrachtung eines einzelnen Zeitpunktes deutliche Unterschiede sichtbar sind, die sich am siebten Tag anders darstellen als am zehnten. Schon bei der engmaschigen Betrachtung in den ersten Stunden stellen sich erhebliche Veränderungen ein, wie in 3.2.2. beschrieben.

4.2.4 Einfluss von HHV-6 auf die GVHD

Das Auftreten einer akuten GVHD scheint mit einer Reaktivierung von HHV-6 in stammzelltransplantierten Patienten in Verbindung zu stehen (Hentrich et al., 2005). Appleton el al. beschrieben, dass HHV-6 wahrscheinlich eher eine GVHD auszulösen oder eine Exazerbation dieser herbeizuführen vermag, als dass HHV-6 in Folge einer GVHD reaktiviert wird (Appleton et al., 1995). Eine signifikante Korrelation von einer GVHD mit der Detektion von HHV-6 konnte von einigen Studien bestätigt (Maeda et al., 1999; Wang et al., 1999; Zerr et al., 2005), von anderen nicht bestätigt werden (Kadakia et al., 1996; Wang et al., 1996). Zuletzt wurde jedoch die Hypothese gestützt, dass eine HHV-6 Reaktivierung eine Zytokinsynthese induziert, die zu einer akuten GVHD in Stammzelltransplantierten Patienten führen kann (Fujita et al., 2008).

Betrachtet man das Verhalten der Zytokine in dieser Arbeit nach einer Infektion mit HHV-6, zeigt sich, dass die Infektion mit HHV-6A anfangs zu einer verstärkten Expression der gemessenen Zytokine führt und nur IL-2 vermindert exprimiert wird. Dies impliziert, dass auf Zytokinebene eine verminderte GVHD auftreten müsste, da IL-2 als pro-inflammatorisches Zytokin vermindert exprimiert wird. Bei der Infektion mit HHV-6B ist kurzzeitig erhöhte Expression von IFN-γ gefunden worden, was wiederum für eine erhöhte pro-inflammatorische Reaktion und somit für ein erhöhtes Risiko einer GVHD spricht.

Eine Unterscheidung der HHV-6 Varianten A und B kam in der Literatur meist nicht zur Berücksichtigung. Zuletzt wurde beschrieben, dass das Vorhandensein von HHV-6B DNA dem Ausbruch einer GVHD vorangeht und somit zu einer Immunsuppression führt (Radonic et al., 2005). Viele GVHD assoziierte Erkrankungen werden im allgemeinen dem HHV-6B zugesprochen. HHV-6A fand sich bisher nur im Zusammenhang mit neurotropen Erkrankungen (De Bolle et al., 2005).

Diskussion

Insgesamt ist auf Basis der ermittelten Daten der vorliegenden Arbeit schlusszufolgern, dass die Zytokinregulation von HHV-6B zu einer akuten GHVD mit entsprechend schwerwiegendem Krankheitsprofil führen kann.

Für eine genauere Einschätzung bezüglich eines erhöhten Risikos einer GVHD auf Zytokinebene, könnte in weiterführenden Versuchen eine größeres Kollektiv im zeitlichen Verlauf beobachtet werden. Darüber hinaus bestünde die Möglichkeit der Sortierung einzelner Lymphozytensubpopulationen, insbesondere in CD45Ro⁺ und CD45 Ra⁺ Zellen, um im Einzelnen deren Zytokinproduktion zu bestimmen.

Des Weiteren vermag eine intrazelluläre Zytokinfärbung weitere Erkenntnisse zu geben. Hierbei handelt es sich um eine semiquantitative Methode, bei der diejenigen Zellen einzeln erfasst werden, die für das angefärbte Zytokin zu einem bestimmten Zeitpunkt positiv sind. Durch eine gleichzeitige Anfärbung der kennzeichnenden Oberflächenepitope können diese Zellen phänotypisch charakterisiert werden.

In einem weiteren Ansatz wäre denkbar, näher auf die Translation einzugehen, um die Veränderungen von mRNA zu Protein genauer zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

Eine Stammzelltransplantation als möglicherweise einzige Therapiemöglichkeit für einige hämatologische Erkrankungen wird häufig durch eine GVHD limitiert. Um die Komplikationen der GVHD zu minimieren, stellt eine Nabelschnurbluttransplantation eine vielversprechende Alternative zur KMT dar.

Die Unterschiede von peripherem Blut gegenüber Nabelschnurblut bestehen vorwiegend im großen Anteil naiver Zellen im Nabelschnurblut, der in dieser Arbeit in FACS-Analysen bei über 95% liegt und damit etwa doppelt so hoch ist wie in peripherem Blut. Dieser Reifegrad spiegelt sich auch in einem unterschiedlichen Zytokinmuster wider. Wie hier gezeigt, sind in Nabelschnurblut weniger pro-inflammatorische Zytokine (von Th1-Zellen gebildet) und mehr anti-inflammatorische Zytokine (von Th2-Zellen gebildet) vorhanden, wodurch sich das Auftreten oder die Ausprägung einer GVHD vermindern lassen könnte.

Verschiedene Kombinationen von mitogenen und Oberflächenrezeptor stimulierenden Antikörpern sind fähig, eine Induktion von Th1-, Th2- und hämatopoetischen Zytokinen in verschiedenem Ausmaß herbeizuführen. Die durchgeführten Untersuchungen belegen, dass die Fähigkeit zur Zytokinproduktion generell vermindert ist, was sich ebenfalls günstig auf den Ausbruch und Verlauf einer GVHD auswirken kann.

Die vorliegende Arbeit veranschaulicht, dass die verminderte Zytokinproduktion nicht nur durch verschiedene Populationen von naiven und Gedächtnis-T-Zellen hervorgerufen wird, sondern vielmehr durch eine verminderte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB.

Die gewonnenen Erkenntnisse lassen ferner darauf schließen, dass die Unterschiede in der Zytokinproduktion von Th1- und Th2-Zellen durch die unterschiedliche Expression von den für diese Zellen spezifischen Transkriptionsfaktoren T-bet und c-maf zu erklären sind. Somit könnte die bisher beobachtete verminderte Inzidenz und Ausprägung der GVHD bei der allogenen Transplantation von Nabelschnurblut durch eine verminderte Aktivierung der spezifischen Transkriptionsfaktoren hervorgerufen sein, die zu einer verminderten Produktion verschiedener Zytokine führt.

Die Literatur beschreibt, dass eine HHV-6 Reaktivierung eine Zytokinsynthese induziert, die das Auftreten einer akuten GVHD in Stammzell transplantierten Patienten begünstigt. Bei der Betrachtung der Zytokinexpression in Nabelschnurblut bei einer zusätzlichen Infektion mit HHV-6A und HHV-6B über einen zeitlichen Verlauf ließ sich im Rahmen der Untersuchungen

Zusammenfassung

der vorliegenden Arbeit beobachten, dass IL-2 als pro-inflammatorisches Zytokin in Anwesenheit von HHV-6A vermindert exprimiert wird und HHV-6B zu einer erhöhten Expression des pro-inflammatorischen Zytokins IFN-γ führt. Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass eine Myelosuppression auf direktem Wege über eine von HHV-6 veränderte Zytokin-Sekretion bewirkt werden könnte. Dies bedeutet, dass die Zytokinregulation von HHV-6B zu einer akuten GHVD mit entsprechend schwerwiegendem Krankheitsprofil führen kann und somit ein hohes Risiko darstellt.

Diese Arbeit entstand in einem Kooperationsprojekt mit PD Dr. Andreas Pahl und dem Institut für klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität Erlangen.

Teile der Arbeit wurden im August 2007 veröffentlicht: Nitsche, A., Zhang, M., Clauss, T., Siegert, W., Brune, K., Pahl, A. (2007). Cytokine profiles of cord and adult blood leukocytes: differences in expression are due to differences in expression and activation of transcription factors. BMC. Immunol. *8*, 18. (Nitsche et al., 2007).

6. Literatur

- 1. Abbas, A.K., Murphy, K.M., and Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. Nature *383*, 787-793.
- 2. Ablashi, D.V., Balachandran, N., Josephs, S.F., Hung, C.L., Krueger, G.R., Kramarsky, B., Salahuddin, S.Z., and Gallo, R.C. (1991). Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates. Virology *184*, 545-552.
- 3. Adkins,B. (2000). Development of neonatal Th1/Th2 function. Int. Rev. Immunol. *19*, 157-171.
- 4. Agnello, D., Lankford, C.S., Bream, J., Morinobu, A., Gadina, M., O'Shea, J.J., and Frucht, D.M. (2003). Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. J. Clin. Immunol. *23*, 147-161.
- 5. Antin, J.H. and Ferrara, J.L. (1992). Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. Blood *80*, 2964-2968.
- 6. Appleton, A.L., Sviland, L., Peiris, J.S., Taylor, C.E., Wilkes, J., Green, M.A., Pearson, A.D., Kelly, P.J., Malcolm, A.J., Proctor, S.J., and . (1995). Human herpes virus-6 infection in marrow graft recipients: role in pathogenesis of graft-versus-host disease. Newcastle upon Tyne Bone Marrow Transport Group. Bone Marrow Transplant. *16*, 777-782.
- 7. Arena, A., Liberto, M.C., Iannello, D., Capozza, A.B., and Foca, A. (1999). Altered cytokine production after human herpes virus type 6 infection. New Microbiol. *22*, 293-300.
- 8. Asano, Y., Yoshikawa, T., Suga, S., Kobayashi, I., Nakashima, T., Yazaki, T., Kajita, Y., and Ozaki, T. (1994). Clinical features of infants with primary human herpesvirus 6 infection (exanthem subitum, roseola infantum). Pediatrics *93*, 104-108.
- 9. Baker, M.B., Altman, N.H., Podack, E.R., and Levy, R.B. (1996). The role of cell-mediated cytotoxicity in acute GVHD after MHC-matched allogeneic bone marrow transplantation in mice. J. Exp. Med. *183*, 2645-2656.
- 10. Barker, J.N., Davies, S.M., DeFor, T., Ramsay, N.K., Weisdorf, D.J., and Wagner, J.E. (2001). Survival after transplantation of unrelated donor umbilical cord blood is comparable to that of human leukocyte antigen-matched unrelated donor bone marrow: results of a matched-pair analysis. Blood *97*, 2957-2961.
- 11. Barker, J.N. and Wagner, J.E. (2003a). Umbilical cord blood transplantation: current practice and future innovations. Crit Rev. Oncol. Hematol. 48, 35-43.
- 12. Barker, J.N. and Wagner, J.E. (2003b). Umbilical-cord blood transplantation for the treatment of cancer. Nat. Rev. Cancer *3*, 526-532.
- 13. Beck,R. and Lam-Po-Tang,P.R. (1994). Comparison of cord blood and adult blood lymphocyte normal ranges: a possible explanation for decreased severity of graft versus host disease after cord blood transplantation. Immunol. Cell Biol. *72*, 440-444.

- 14. Ben Sasson, S.Z., Gerstel, R., Hu-Li, J., and Paul, W.E. (2001). Cell division is not a "clock" measuring acquisition of competence to produce IFN-gamma or IL-4. J. Immunol. *166*, 112-120.
- 15. Biberfeld,P., Kramarsky,B., Salahuddin,S.Z., and Gallo,R.C. (1987). Ultrastructural characterization of a new human B lymphotropic DNA virus (human herpesvirus 6) isolated from patients with lymphoproliferative disease. J. Natl. Cancer Inst. 79, 933-941.
- 16. Billingham, R.E. (1966). The biology of graft-versus-host reactions. Harvey Lect. *62*, 21-78.
- 17. Boutolleau, D., Fernandez, C., Andre, E., Imbert-Marcille, B.M., Milpied, N., Agut, H., and Gautheret-Dejean, A. (2003). Human herpesvirus (HHV)-6 and HHV-7: two closely related viruses with different infection profiles in stem cell transplantation recipients. J. Infect. Dis. *187*, 179-186.
- 18. Bradstock, K.F., Luxford, C., and Grimsley, P.G. (1993). Functional and phenotypic assessment of neonatal human leucocytes expressing natural killer cell-associated antigens. Immunol. Cell Biol. *71 (Pt 6)*, 535-542.
- 19. Braun, D.K., Dominguez, G., and Pellett, P.E. (1997). Human herpesvirus 6. Clin. Microbiol. Rev. 10, 521-567.
- 20. Braun, M.Y., Lowin, B., French, L., Acha-Orbea, H., and Tschopp, J. (1996). Cytotoxic T cells deficient in both functional fas ligand and perforin show residual cytolytic activity yet lose their capacity to induce lethal acute graft-versus-host disease. J. Exp. Med. 183, 657-661.
- 21. Burd,E.M., Knox,K.K., and Carrigan,D.R. (1993). Human herpesvirus-6-associated suppression of growth factor-induced macrophage maturation in human bone marrow cultures. Blood *81*, 1645-1650.
- 22. Burstein, E. and Duckett, C.S. (2003). Dying for NF-kappaB? Control of cell death by transcriptional regulation of the apoptotic machinery. Curr. Opin. Cell Biol. *15*, 732-737.
- 23. Cairo,M.S., Suen,Y., Knoppel,E., van,d., V, Nguyen,A., and Sender,L. (1991). Decreased stimulated GM-CSF production and GM-CSF gene expression but normal numbers of GM-CSF receptors in human term newborns compared with adults. Pediatr. Res. *30*, 362-367.
- 24. Campadelli-Fiume, G., Mirandola, P., and Menotti, L. (1999). Human herpesvirus 6: An emerging pathogen. Emerg. Infect. Dis. 5, 353-366.
- 25. Carnevale-Schianca, F., Martin, P., Sullivan, K., Flowers, M., Gooley, T., Anasetti, C., Deeg, J., Furlong, T., McSweeney, P., Storb, R., and Nash, R.A. (2000). Changing from cyclosporine to tacrolimus as salvage therapy for chronic graft-versus-host disease. Biol. Blood Marrow Transplant. *6*, 613-620.
- 26. Carrigan, D.R. and Knox, K.K. (1994). Human herpesvirus 6 (HHV-6) isolation from bone marrow: HHV-6- associated bone marrow suppression in bone marrow transplant patients. Blood *84*, 3307-3310.

- 27. Caserta, M.T., Mock, D.J., and Dewhurst, S. (2001). Human herpesvirus 6. Clin. Infect. Dis. *33*, 829-833.
- 28. Chalmers, I.M., Janossy, G., Contreras, M., and Navarrete, C. (1998). Intracellular cytokine profile of cord and adult blood lymphocytes. Blood *92*, 11-18.
- 29. Chao, N.J., Snyder, D.S., Jain, M., Wong, R.M., Niland, J.C., Negrin, R.S., Long, G.D., Hu, W.W., Stockerl-Goldstein, K.E., Johnston, L.J., Amylon, M.D., Tierney, D.K., O'Donnell, M.R., Nademanee, A.P., Parker, P., Stein, A., Molina, A., Fung, H., Kashyap, A., Kohler, S., Spielberger, R., Krishnan, A., Rodriguez, R., Forman, S.J., and Bluzme, K.G. (2000). Equivalence of 2 effective graft-versus-host disease prophylaxis regimens: results of a prospective double-blind randomized trial. Biol. Blood Marrow Transplant. 6, 254-261.
- 30. Cherwinski, H.M., Schumacher, J.H., Brown, K.D., and Mosmann, T.R. (1987). Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. J. Exp. Med. *166*, 1229-1244.
- 31. Chipeta, J., Komeda, Y., Zhang, X.L., Sakurai, M., and Azuma, E. (1999). Intracellular cytokine profiles of cord and adult blood lymphocytes. Blood *93*, 1120-1122.
- 32. Cirone, M., Campadelli-Fiume, G., Foa-Tomasi, L., Torrisi, M.R., and Faggioni, A. (1994). Human herpesvirus 6 envelope glycoproteins B and H-L complex are undetectable on the plasma membrane of infected lymphocytes. AIDS Res. Hum. Retroviruses *10*, 175-179.
- 33. Cirone,M., Zompetta,C., Angeloni,A., Ablashi,D.V., Salahuddin,S.Z., Pavan,A., Torrisi,M.R., Frati,L., and Faggioni,A. (1992). Infection by human herpesvirus 6 (HHV-6) of human lymphoid T cells occurs through an endocytic pathway. AIDS Res. Hum. Retroviruses *8*, 2031-2037.
- 34. Clark, D.A. (2000). Human herpesvirus 6. Rev. Med. Virol. 10, 155-173.
- 35. Cohen,S.B. and Madrigal,J.A. (1998). Immunological and functional differences between cord and peripheral blood. Bone Marrow Transplant. *21 Suppl 3*, S9-12.
- 36. Cohen,S.B., Perez-Cruz,I., Fallen,P., Gluckman,E., and Madrigal,J.A. (1999). Analysis of the cytokine production by cord and adult blood. Hum. Immunol. *60*, 331-336.
- 37. Cohen, S.B., Wang, X.N., and Dickinson, A. (2000). Can cord blood cells support the cytokine storm in GvHD? Cytokine Growth Factor Rev. 11, 185-197.
- 38. Cohen, Y. and Nagler, A. (2004). Cord blood biology and transplantation. Isr. Med. Assoc. J. 6, 39-46.
- 39. Cone,R.W., Huang,M.L., Corey,L., Zeh,J., Ashley,R., and Bowden,R. (1999). Human herpesvirus 6 infections after bone marrow transplantation: clinical and virologic manifestations. J. Infect. Dis. *179*, 311-318.
- 40. D'Arena,G., Musto,P., Cascavilla,N., Di Giorgio,G., Fusilli,S., Zendoli,F., and Carotenuto,M. (1998). Flow cytometric characterization of human umbilical cord blood lymphocytes: immunophenotypic features. Haematologica *83*, 197-203.

- 41. D'Arena, G., Musto, P., Cascavilla, N., Minervini, M.M., Di Giorgio, G., Maglione, A., and Carotenuto, M. (1999). Inability of activated cord blood T lymphocytes to perform Thl-like and Th2-like responses: implications for transplantation. J. Hematother. Stem Cell Res. *8*, 381-385.
- 42. De Bolle, L., Naesens, L., and De Clercq, E. (2005). Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. Clin. Microbiol. Rev. *18*, 217-245.
- 43. de La Selle, V., Gluckman, E., and Bruley-Rosset, M. (1998). Graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effect in mice grafted with peripheral newborn blood. Blood *92*, 3968-3975.
- 44. De Lima,M., St John,L.S., Wieder,E.D., Lee,M.S., McMannis,J., Karandish,S., Giralt,S., Beran,M., Couriel,D., Korbling,M., Bibawi,S., Champlin,R., and Komanduri,K.V. (2002). Double-chimaerism after transplantation of two human leucocyte antigen mismatched, unrelated cord blood units. Br. J. Haematol. *119*, 773-776.
- 45. de Wynter, E.A., Coutinho, L.H., Pei, X., Marsh, J.C., Hows, J., Luft, T., and Testa, N.G. (1995). Comparison of purity and enrichment of CD34+ cells from bone marrow, umbilical cord and peripheral blood (primed for apheresis) using five separation systems. Stem Cells *13*, 524-532.
- 46. Deeg,H.J. and Henslee-Downey,P.J. (1990). Management of acute graft-versus-host disease. Bone Marrow Transplant. *6*, 1-8.
- 47. Del Prete, G.F., De Carli, M., Ricci, M., and Romagnani, S. (1991). Helper activity for immunoglobulin synthesis of T helper type 1 (Th1) and Th2 human T cell clones: the help of Th1 clones is limited by their cytolytic capacity. J. Exp. Med. *174*, 809-813.
- 48. Dickinson, A.M., Sviland, L., Hamilton, P.J., Usher, P., Taylor, P., Jackson, G., Dunn, J., and Proctor, S.J. (1994). Cytokine involvement in predicting clinical graft-versus-host disease in allogeneic bone marrow transplant recipients. Bone Marrow Transplant. *13*, 65-70.
- 49. Drobyski, W.R., Dunne, W.M., Burd, E.M., Knox, K.K., Ash, R.C., Horowitz, M.M., Flomenberg, N., and Carrigan, D.R. (1993). Human herpesvirus-6 (HHV-6) infection in allogeneic bone marrow transplant recipients: evidence of a marrow-suppressive role for HHV-6 in vivo. J. Infect. Dis. *167*, 735-739.
- 50. Farrar, J.D., Ouyang, W., Lohning, M., Assenmacher, M., Radbruch, A., Kanagawa, O., and Murphy, K.M. (2001). An instructive component in T helper cell type 2 (Th2) development mediated by GATA-3. J. Exp. Med. *193*, 643-650.
- 51. Ferrara, J., Guillen, F.J., Sleckman, B., Burakoff, S.J., and Murphy, G.F. (1986). Cutaneous acute graft-versus-host disease to minor histocompatibility antigens in a murine model: histologic analysis and correlation to clinical disease. J. Invest Dermatol. 86, 371-375.
- 52. Ferrara, J.L. and Deeg, H.J. (1991). Graft-versus-host disease. N. Engl. J. Med. *324*, 667-674.
- 53. Flamand, L., Gosselin, J., D'Addario, M., Hiscott, J., Ablashi, D.V., Gallo, R.C., and Menezes, J. (1991). Human herpesvirus 6 induces interleukin-1 beta and tumor necrosis

- factor alpha, but not interleukin-6, in peripheral blood mononuclear cell cultures. J. Virol. 65, 5105-5110.
- 54. Flamand, L., Gosselin, J., Stefanescu, I., Ablashi, D., and Menezes, J. (1995). Immunosuppressive effect of human herpesvirus 6 on T-cell functions: suppression of interleukin-2 synthesis and cell proliferation. Blood *85*, 1263-1271.
- 55. Flamand, L., Romerio, F., Reitz, M.S., and Gallo, R.C. (1998). CD4 promoter transactivation by human herpesvirus 6. J. Virol. 72, 8797-8805.
- 56. Fujita, A., Ihira, M., Suzuki, R., Enomoto, Y., Sugiyama, H., Sugata, K., Suga, S., Asano, Y., Yagasaki, H., Kojima, S., Matsumoto, K., Kato, K., and Yoshikawa, T. (2008). Elevated serum cytokine levels are associated with human herpesvirus 6 reactivation in hematopoietic stem cell transplantation recipients. J. Infect. *57*, 241-248.
- 57. Garderet, L., Dulphy, N., Douay, C., Chalumeau, N., Schaeffer, V., Zilber, M.T., Lim, A., Even, J., Mooney, N., Gelin, C., Gluckman, E., Charron, D., and Toubert, A. (1998). The umbilical cord blood alphabeta T-cell repertoire: characteristics of a polyclonal and naive but completely formed repertoire. Blood *91*, 340-346.
- 58. Gardiner, C.M., Meara, A.O., and Reen, D.J. (1998). Differential cytotoxicity of cord blood and bone marrow-derived natural killer cells. Blood *91*, 207-213.
- 59. Gluckman, E. (1989). Recent trends in allogeneic bone marrow transplantation. Clin. Transpl. 123-128.
- 60. Gluckman, E., Rocha, V., Boyer-Chammard, A., Locatelli, F., Arcese, W., Pasquini, R., Ortega, J., Souillet, G., Ferreira, E., Laporte, J.P., Fernandez, M., and Chastang, C. (1997). Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. N. Engl. J. Med. *337*, 373-381.
- 61. Han,P. and Hodge,G. (1999). Intracellular cytokine production and cytokine receptor interaction of cord mononuclear cells: relevance to cord blood transplantation. Br. J. Haematol. *107*, 450-457.
- 62. Harnett, G.B., Farr, T.J., Pietroboni, G.R., and Bucens, M.R. (1990). Frequent shedding of human herpesvirus 6 in saliva. J. Med. Virol. *30*, 128-130.
- 63. Harris, D.T., Schumacher, M.J., LoCascio, J., Besencon, F.J., Olson, G.B., DeLuca, D., Shenker, L., Bard, J., and Boyse, E.A. (1992). Phenotypic and functional immaturity of human umbilical cord blood T lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 89, 10006-10010.
- 64. Hassan, J. and Reen, D.J. (1997). Cord blood CD4+ CD45RA+ T cells achieve a lower magnitude of activation when compared with their adult counterparts. Immunology *90*, 397-401.
- 65. Hebart, H., Einsele, H., Klein, R., Fischer, I., Buhler, S., Dietz, K., Jahn, G., Berg, P.A., Kanz, L., and Muller, C.A. (1996). CMV infection after allogeneic bone marrow transplantation is associated with the occurrence of various autoantibodies and monoclonal gammopathies. Br. J. Haematol. 95, 138-144.

- 66. Hentrich, M., Oruzio, D., Jager, G., Schlemmer, M., Schleuning, M., Schiel, X., Hiddemann, W., and Kolb, H.J. (2005). Impact of human herpesvirus-6 after haematopoietic stem cell transplantation. Br. J. Haematol. *128*, 66-72.
- 67. Hill,G.R., Krenger,W., and Ferrara,J.L. (1997). The role of cytokines in acute graft-versus-host disease. Cytokines Cell Mol. Ther. *3*, 257-266.
- 68. Ho,I.C., Hodge,M.R., Rooney,J.W., and Glimcher,L.H. (1996). The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. Cell *85*, 973-983.
- 69. Ho,I.C., Lo,D., and Glimcher,L.H. (1998). c-maf promotes T helper cell type 2 (Th2) and attenuates Th1 differentiation by both interleukin 4-dependent and -independent mechanisms. J. Exp. Med. *188*, 1859-1866.
- 70. Hoffman,R.A., Langrehr,J.M., and Simmons R.L. (1995). Induction of nitric oxide synthesis during the immune response. In Chimerism and Tolerance, S.T.Ildstad, ed. Landes, R. G.), pp. 79-84.
- 71. Holler, E., Kolb, H.J., Moller, A., Kempeni, J., Liesenfeld, S., Pechumer, H., Lehmacher, W., Ruckdeschel, G., Gleixner, B., Riedner, C., and (1990). Increased serum levels of tumor necrosis factor alpha precede major complications of bone marrow transplantation. Blood *75*, 1011-1016.
- 72. Ibelgauft, Horst. Cytokines & Cells Online Pathfinder Encyclopaedia. http://www.copewithcytokines.de/. 1-4-2007.
- 73. Ihira,M., Yoshikawa,T., Suzuki,K., Ohashi,M., Suga,S., Horibe,K., Tanaka,N., Kimura,H., Kojima,S., Kato,K., Matsuyama,T., Nishiyama,Y., and Asano,Y. (2002). Monitoring of active HHV-6 infection in bone marrow transplant recipients by real time PCR; comparison to detection of viral DNA in plasma by qualitative PCR. Microbiol. Immunol. *46*, 701-705.
- 74. Janeway, C.A. jr., Travers, P., Hunt, S., and Walport, M. (2002). Immunologie. (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag).
- 75. Kadakia, M.P., Rybka, W.B., Stewart, J.A., Patton, J.L., Stamey, F.R., Elsawy, M., Pellett, P.E., and Armstrong, J.A. (1996). Human herpesvirus 6: infection and disease following autologous and allogeneic bone marrow transplantation. Blood *87*, 5341-5354.
- 76. Kadereit, S., Mohammad, S.F., Miller, R.E., Woods, K.D., Listrom, C.D., McKinnon, K., Alali, A., Bos, L.S., Iacobucci, M.L., Sramkoski, M.R., Jacobberger, J.W., and Laughlin, M.J. (1999). Reduced NFAT1 protein expression in human umbilical cord blood T lymphocytes. Blood *94*, 3101-3107.
- 77. Keever, C.A. (1993). Characterization of cord blood lymphocyte subpopulations. J. Hematother. *2*, 203-206.
- 78. Kernan, N.A., Collins, N.H., Juliano, L., Cartagena, T., Dupont, B., and O'Reilly, R.J. (1986). Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-v-host disease. Blood *68*, 770-773.

- 79. Kesson, A.M. and Bryson, Y.J. (1991). Uptake of extracellular Ca2+ is a requirement for production of interferon-gamma by cord blood mononuclear cells. J. Interferon Res. 11, 81-86.
- 80. Kikuta,H., Nakane,A., Lu,H., Taguchi,Y., Minagawa,T., and Matsumoto,S. (1990). Interferon induction by human herpesvirus 6 in human mononuclear cells. J. Infect. Dis. *162*, 35-38.
- 81. Kilpatrick, D.C., Downing, I., Palmer, J.B., and Turner, M.L. (2004). Comparison of adult and fetal cytokine secretion during mixed lymphocyte reactions. Immunol. Lett. *91*, 55-61.
- 82. Kim,J.I., Ho,I.C., Grusby,M.J., and Glimcher,L.H. (1999). The transcription factor c-Maf controls the production of interleukin-4 but not other Th2 cytokines. Immunity. *10*, 745-751.
- 83. Kishikawa, H., Sun, J., Choi, A., Miaw, S.C., and Ho, I.C. (2001). The cell type-specific expression of the murine IL-13 gene is regulated by GATA-3. J. Immunol. *167*, 4414-4420.
- 84. Kogler, G., Middleton, P.G., Wilke, M., Rocha, V., Esendam, B., Enczmann, J., Wernet, P., Gluckman, E., Querol, S., Lecchi, L., Goulmy, E., and Dickinson, A.M. (2002). Recipient cytokine genotypes for TNF-alpha and IL-10 and the minor histocompatibility antigens HY and CD31 codon 125 are not associated with occurrence or severity of acute GVHD in unrelated cord blood transplantation: a retrospective analysis. Transplantation 74, 1167-1175.
- 85. Kogler, G., Nurnberger, W., Fischer, J., Niehues, T., Somville, T., Gobel, U., and Wernet, P. (1999). Simultaneous cord blood transplantation of ex vivo expanded together with non-expanded cells for high risk leukemia. Bone Marrow Transplant. *24*, 397-403.
- 86. Korngold, R. and Sprent, J. (1987). T cell subsets and graft-versus-host disease. Transplantation *44*, 335-339.
- 87. Krampera, M., Tavecchia, L., Benedetti, F., Nadali, G., and Pizzolo, G. (2000). Intracellular cytokine profile of cord blood T-, and NK- cells and monocytes. Haematologica *85*, 675-679.
- 88. Krenger, W., Cooke, K.R., Crawford, J.M., Sonis, S.T., Simmons, R., Pan, L., Delmonte, J., Jr., Karandikar, M., and Ferrara, J.L. (1996). Transplantation of polarized type 2 donor T cells reduces mortality caused by experimental graft-versus-host disease. Transplantation *62*, 1278-1285.
- 89. Krenger, W. and Ferrara, J.L. (1996). Graft-versus-host disease and the Th1/Th2 paradigm. Immunol. Res. *15*, 50-73.
- 90. Krueger, G.R. and Ablashi, D.V. (2003). Human herpesvirus-6: a short review of its biological behavior. Intervirology *46*, 257-269.
- 91. Kurata,H., Lee,H.J., McClanahan,T., Coffman,R.L., O'Garra,A., and Arai,N. (2002). Friend of GATA is expressed in naive Th cells and functions as a repressor of GATA-3-mediated Th2 cell development. J. Immunol. *168*, 4538-4545.

- 92. Kurtzberg, J., Laughlin, M., Graham, M.L., Smith, C., Olson, J.F., Halperin, E.C., Ciocci, G., Carrier, C., Stevens, C.E., and Rubinstein, P. (1996). Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. N. Engl. J. Med. *335*, 157-166.
- 93. Lee,H.J., O'Garra,A., Arai,K., and Arai,N. (1998). Characterization of cis-regulatory elements and nuclear factors conferring Th2-specific expression of the IL-5 gene: a role for a GATA-binding protein. J. Immunol. *160*, 2343-2352.
- 94. Lewis, D.B., Yu, C.C., Meyer, J., English, B.K., Kahn, S.J., and Wilson, C.B. (1991). Cellular and molecular mechanisms for reduced interleukin 4 and interferon-gamma production by neonatal T cells. J. Clin. Invest 87, 194-202.
- 95. Li,C., Goodrich,J.M., and Yang,X. (1997). Interferon-gamma (IFN-gamma) regulates production of IL-10 and IL-12 in human herpesvirus-6 (HHV-6)-infected monocyte/macrophage lineage. Clin. Exp. Immunol. *109*, 421-425.
- 96. Lichtman A., Krenger, W., and Ferrara, J.L.M. (1997). Cytokine networks. In Graft-vs-Host Disease, J.L.M.Ferrara, H.J.Deeg, and S.J.Burakoff, eds. (New York: Marcel Dekker), pp. 179-218.
- 97. Liszewski, M.K., Post, T.W., and Atkinson, J.P. (1991). Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. Annu. Rev. Immunol. *9*, 431-455.
- 98. Lopez, C. (1993). Human Herpesvirus 6 and 7., B.Roizman, R.J.Whitley, and C.Lopez, eds. (New York: Raven Press).
- 99. Luppi,M., Barozzi,P., Morris,C., Maiorana,A., Garber,R., Bonacorsi,G., Donelli,A., Marasca,R., Tabilio,A., and Torelli,G. (1999). Human herpesvirus 6 latently infects early bone marrow progenitors in vivo. J. Virol. *73*, 754-759.
- 100. Maeda, Y., Teshima, T., Yamada, M., Shinagawa, K., Nakao, S., Ohno, Y., Kojima, K., Hara, M., Nagafuji, K., Hayashi, S., Fukuda, S., Sawada, H., Matsue, K., Takenaka, K., Ishimaru, F., Ikeda, K., Niiya, K., and Harada, M. (1999). Monitoring of human herpesviruses after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation and bone marrow transplantation. Br. J. Haematol. *105*, 295-302.
- 101. Maltezou, H.C., Kafetzis, D.A., Abisaid, D., Mantzouranis, E.C., Chan, K.W., and Rolston, K.V. (2000). Viral infections in children undergoing hematopoietic stem cell transplant. Pediatr. Infect. Dis. J. 19, 307-312.
- 102. Mayne,M., Cheadle,C., Soldan,S.S., Cermelli,C., Yamano,Y., Akhyani,N., Nagel,J.E., Taub,D.D., Becker,K.G., and Jacobson,S. (2001). Gene expression profile of herpesvirus-infected T cells obtained using immunomicroarrays: induction of proinflammatory mechanisms. J. Virol. *75*, 11641-11650.
- 103. Meyer, T.P., Hofmann, B., Zaisserer, J., Jacobs, V.R., Fuchs, B., Rapp, S., Weinauer, F., and Burkhart, J. (2006). Analysis and cryopreservation of hematopoietic stem and progenitor cells from umbilical cord blood. Cytotherapy. *8*, 265-276.

- 104. Michejda, M. (2004). Which stem cells should be used for transplantation? Fetal Diagn. Ther. 19, 2-8.
- 105. Mills,K.C., Gross,T.G., Varney,M.L., Heimann,D.G., Reed,E.C., Kessinger,A., and Talmadge,J.E. (1996). Immunologic phenotype and function in human bone marrow, blood stem cells and umbilical cord blood. Bone Marrow Transplant. *18*, 53-61.
- 106. Miyamoto, K., Tsuji, K., Maekawa, T., Asano, S., and Nakahata, T. (2001). Inhibitory effect of interleukin 3 on early development of human B-lymphopoiesis. Br. J. Haematol. *114*, 690-697.
- 107. Modrow, S. and Falke, D. (1997). Molekulare Virologie. (Heidelberg: Spektrum Verlag).
- 108. Mookerjee,B.P. and Vogelsang,G. (1997). Human herpes virus-6 encephalitis after bone marrow transplantation: successful treatment with ganciclovir. Bone Marrow Transplant. 20, 905-906.
- 109. Moore, K.W., O'Garra, A., de Waal, M.R., Vieira, P., and Mosmann, T.R. (1993). Interleukin-10. Annu. Rev. Immunol. *11*, 165-190.
- 110. Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J. Immunol. *136*, 2348-2357.
- 111. Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu. Rev. Immunol. 7, 145-173.
- 112. Mosmann, T.R. and Fong, T.A. (1989). Specific assays for cytokine production by T cells. J. Immunol. Methods *116*, 151-158.
- 113. Mosmann, T.R. and Sad, S. (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunol. Today *17*, 138-146.
- 114. Murphy, K.M., Ouyang, W., Farrar, J.D., Yang, J., Ranganath, S., Asnagli, H., Afkarian, M., and Murphy, T.L. (2000). Signaling and transcription in Thelper development. Annu. Rev. Immunol. *18*, 451-494.
- 115. Nash,R.A., Antin,J.H., Karanes,C., Fay,J.W., Avalos,B.R., Yeager,A.M., Przepiorka,D., Davies,S., Petersen,F.B., Bartels,P., Buell,D., Fitzsimmons,W., Anasetti,C., Storb,R., and Ratanatharathorn,V. (2000). Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors. Blood *96*, 2062-2068.
- 116. Nitsche, A., Zhang, M., Clauss, T., Siegert, W., Brune, K., and Pahl, A. (2007). Cytokine profiles of cord and adult blood leukocytes: differences in expression are due to differences in expression and activation of transcription factors. BMC. Immunol. 8, 18.
- 117. Paliogianni, F., Hama, N., Mavrothalassitis, G.J., Thyphronitis, G., and Boumpas, D.T. (1996). Signal requirements for interleukin 4 promoter activation in human T cells. Cell Immunol. *168*, 33-38.

- 118. Parker, P.M., Chao, N., Nademanee, A., O'Donnell, M.R., Schmidt, G.M., Snyder, D.S., Stein, A.S., Smith, E.P., Molina, A., Stepan, D.E., Kashyap, A., Planas, I., Spielberger, R., Somlo, G., Margolin, K., Zwingenberger, K., Wilsman, K., Negrin, R.S., Long, G.D., Niland, J.C., Blume, K.G., and Forman, S.J. (1995). Thalidomide as salvage therapy for chronic graft-versus-host disease. Blood *86*, 3604-3609.
- 119. Pick,M., Nagler,A., Grisaru,D., Eldor,A., and Deutsch,V. (1998). Expansion of megakaryocyte progenitors from human umbilical cord blood using a new two-step separation procedure. Br. J. Haematol. *103*, 639-650.
- 120. Prescott,S.L., Macaubas,C., Holt,B.J., Smallacombe,T.B., Loh,R., Sly,P.D., and Holt,P.G. (1998). Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. J. Immunol. *160*, 4730-4737.
- 121. Rabian-Herzog, C., Lesage, S., and Gluckman, E. (1992). Characterization of lymphocyte subpopulations in cord blood. Bone Marrow Transplant. *9 Suppl 1*, 64-67.
- 122. Radonic, A., Oswald, O., Thulke, S., Brockhaus, N., Nitsche, A., Siegert, W., and Schetelig, J. (2005). Infections with human herpesvirus 6 variant B delay platelet engraftment after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. Br. J. Haematol. *131*, 480-482.
- 123. Rapaport,D., Engelhard,D., Tagger,G., Or,R., and Frenkel,N. (2002). Antiviral prophylaxis may prevent human herpesvirus-6 reactivation in bone marrow transplant recipients. Transpl. Infect. Dis. *4*, 10-16.
- 124. Ratanatharathorn, V., Nash, R.A., Przepiorka, D., Devine, S.M., Klein, J.L., Weisdorf, D., Fay, J.W., Nademanee, A., Antin, J.H., Christiansen, N.P., van der, J.R., Herzig, R.H., Litzow, M.R., Wolff, S.N., Longo, W.L., Petersen, F.B., Karanes, C., Avalos, B., Storb, R., Buell, D.N., Maher, R.M., Fitzsimmons, W.E., and Wingard, J.R. (1998). Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK506) with methotrexate and cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. Blood *92*, 2303-2314.
- 125. Reiche, D. (2003). Roche Lexikon Medizin. (München Jena: Urban & Fischer).
- 126. Remberger, M., Ringden, O., and Markling, L. (1995). TNF alpha levels are increased during bone marrow transplantation conditioning in patients who develop acute GVHD. Bone Marrow Transplant. *15*, 99-104.
- 127. Ridings, J., Weedon, H., Ioannou, C., Flego, L., Macardle, P.J., and Zola, H. (1996). Purification of cord blood lymphocytes. J. Immunol. Methods *195*, 43-48.
- 128. Ringden,O. (1997). Clinical sprectrum of graft-versus-host disease. In Graft-vs.-Host Disease, J.L.Ferrara, H.J.Deeg, and S.J.Burakoff, eds. (New York: Marcel Dekker), pp. 525-559.
- 129. Risdon, G., Gaddy, J., Stehman, F.B., and Broxmeyer, H.E. (1994). Proliferative and cytotoxic responses of human cord blood T lymphocytes following allogeneic stimulation. Cell Immunol. *154*, 14-24.

Literatur

- 130. Rocha, V., Wagner, J.E., Jr., Sobocinski, K.A., Klein, J.P., Zhang, M.J., Horowitz, M.M., and Gluckman, E. (2000). Graft-versus-host disease in children who have received a cordblood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. N. Engl. J. Med. *342*, 1846-1854.
- 131. Romagnani,S. (1991). Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease. Int. J. Clin. Lab Res. *21*, 152-158.
- 132. Roncarolo, M.G., Bigler, M., Ciuti, E., Martino, S., and Tovo, P.A. (1994). Immune responses by cord blood cells. Blood Cells *20*, 573-585.
- 133. Ruhlmann, A. and Nordheim, A. (1997). Effects of the immunosuppressive drugs CsA and FK506 on intracellular signalling and gene regulation. Immunobiology *198*, 192-206.
- 134. Salahuddin, S.Z., Ablashi, D.V., Markham, P.D., Josephs, S.F., Sturzenegger, S., Kaplan, M., Halligan, G., Biberfeld, P., Wong-Staal, F., Kramarsky, B., and . (1986). Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. Science *234*, 596-601.
- 135. Santoro, F., Kennedy, P.E., Locatelli, G., Malnati, M.S., Berger, E.A., and Lusso, P. (1999). CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. Cell 99, 817-827.
- 136. Sautois,B., Fillet,G., and Beguin,Y. (1997). Comparative cytokine production by in vitro stimulated mononucleated cells from cord blood and adult blood. Exp. Hematol. *25*, 103-108.
- 137. Schmidt, C.A., Oettle, H., Wilborn, F., Jessen, J., Timm, H., Schwerdtfeger, R., Oertel, J., and Siegert, W. (1994). Demonstration of cytomegalovirus after bone marrow transplantation by polymerase chain reaction, virus culture and antigen detection in buffy coat leukocytes. Bone Marrow Transplant. *13*, 71-75.
- 138. Seder,R.A. and Le Gros,G.G. (1995). The functional role of CD8+ T helper type 2 cells. J. Exp. Med. *181*, 5-7.
- 139. Sen,R. and Baltimore,D. (1986). Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. Cell *47*, 921-928.
- 140. Shulman,H.M., Sullivan,K.M., Weiden,P.L., McDonald,G.B., Striker,G.E., Sale,G.E., Hackman,R., Tsoi,M.S., Storb,R., and Thomas,E.D. (1980). Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. Am. J. Med. *69*, 204-217.
- 141. Smith,A., Santoro,F., Di Lullo,G., Dagna,L., Verani,A., and Lusso,P. (2003). Selective suppression of IL-12 production by human herpesvirus 6. Blood *102*, 2877-2884.
- 142. Spitzer, T.R., Cahill, R., Cottler-Fox, M., Treat, J., Sacher, R., and Deeg, H.J. (1990). Transfusion-induced graft-versus-host disease in patients with malignant lymphoma. A case report and review of the literature. Cancer 66, 2346-2349.
- 143. Suga, S., Yoshikawa, T., Asano, Y., Kozawa, T., Nakashima, T., Kobayashi, I., Yazaki, T., Yamamoto, H., Kajita, Y., Ozaki, T., and (1993). Clinical and virological analyses of 21

- infants with exanthem subitum (roseola infantum) and central nervous system complications. Ann. Neurol. 33, 597-603.
- 144. Sullivan, K.M., Shulman, H.M., Storb, R., Weiden, P.L., Witherspoon, R.P., McDonald, G.B., Schubert, M.M., Atkinson, K., and Thomas, E.D. (1981). Chronic graft-versus-host disease in 52 patients: adverse natural course and successful treatment with combination immunosuppression. Blood *57*, 267-276.
- 145. Sutherland, D.R., Keating, A., Nayar, R., Anania, S., and Stewart, A.K. (1994). Sensitive detection and enumeration of CD34+ cells in peripheral and cord blood by flow cytometry. Exp. Hematol. *22*, 1003-1010.
- 146. Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. Cell *100*, 655-669.
- 147. Szabo,S.J., Sullivan,B.M., Stemmann,C., Satoskar,A.R., Sleckman,B.P., and Glimcher,L.H. (2002). Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. Science *295*, 338-342.
- 148. Torrisi, M.R., Gentile, M., Cardinali, G., Cirone, M., Zompetta, C., Lotti, L.V., Frati, L., and Faggioni, A. (1999). Intracellular transport and maturation pathway of human herpesvirus 6. Virology *257*, 460-471.
- 149. Trinchieri,G. (1997). Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN-gamma). Curr. Opin. Immunol. *9*, 17-23.
- 150. van Bekkum, D.W., de Vries, M.J., and van der, W.D. (1967). Lesions characteristic of secondary disease in germfree heterologous radiation chimeras. J. Natl. Cancer Inst. *38*, 223-231.
- 151. Vogelsang, G.B., Farmer, E.R., Hess, A.D., Altamonte, V., Beschorner, W.E., Jabs, D.A., Corio, R.L., Levin, L.S., Colvin, O.M., Wingard, J.R., and (1992). Thalidomide for the treatment of chronic graft-versus-host disease. N. Engl. J. Med. *326*, 1055-1058.
- 152. Vowels,M.R., Honeyman,M., Ziegler,J.B., White,L., Doran,T., and Lam-Po-Tang,R. (1992). Searches for matched and closely matched related and unrelated bone marrow donors undertaken in a single paediatric unit. J. Paediatr. Child Health *28*, 379-382.
- 153. Wagner, J.E., Barker, J.N., DeFor, T.E., Baker, K.S., Blazar, B.R., Eide, C., Goldman, A., Kersey, J., Krivit, W., MacMillan, M.L., Orchard, P.J., Peters, C., Weisdorf, D.J., Ramsay, N.K., and Davies, S.M. (2002). Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. Blood *100*, 1611-1618.
- 154. Wagner, J.E., Rosenthal, J., Sweetman, R., Shu, X.O., Davies, S.M., Ramsay, N.K., McGlave, P.B., Sender, L., and Cairo, M.S. (1996). Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease. Blood 88, 795-802.
- 155. Wang, F., Yao, K., Yin, Q.Z., Zhou, F., Ding, C.L., Peng, G.Y., Xu, J., Chen, Y., Feng, D.J., Ma, C.L., and Xu, W.R. (2006). Human herpesvirus-6-specific interleukin 10-producing

Literatur

- CD4+ T cells suppress the CD4+ T-cell response in infected individuals. Microbiol. Immunol. *50*, 787-803.
- 156. Wang,F.Z., Dahl,H., Linde,A., Brytting,M., Ehrnst,A., and Ljungman,P. (1996). Lymphotropic herpesviruses in allogeneic bone marrow transplantation. Blood *88*, 3615-3620.
- 157. Wang,F.Z., Linde,A., Dahl,H., and Ljungman,P. (1999). Human herpesvirus 6 infection inhibits specific lymphocyte proliferation responses and is related to lymphocytopenia after allogeneic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant. *24*, 1201-1206.
- 158. Wilborn, F., Schmidt, C.A., Brinkmann, V., Jendroska, K., Oettle, H., and Siegert, W. (1994). A potential role for human herpesvirus type 6 in nervous system disease. J. Neuroimmunol. 49, 213-214.
- 159. Wu,A.G., Michejda,M., Mazumder,A., Meehan,K.R., Menendez,F.A., Tchabo,J.G., Slack,R., Johnson,M.P., and Bellanti,J.A. (1999). Analysis and characterization of hematopoietic progenitor cells from fetal bone marrow, adult bone marrow, peripheral blood, and cord blood. Pediatr. Res. *46*, 163-169.
- 160. Yamanishi, K., Okuno, T., Shiraki, K., Takahashi, M., Kondo, T., Asano, Y., and Kurata, T. (1988). Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. Lancet *I*, 1065-1067.
- 161. Yasukawa, M., Hasegawa, A., Sakai, I., Ohminami, H., Arai, J., Kaneko, S., Yakushijin, Y., Maeyama, K., Nakashima, H., Arakaki, R., and Fujita, S. (1999). Down-regulation of CXCR4 by human herpesvirus 6 (HHV-6) and HHV-7. J. Immunol. *162*, 5417-5422.
- 162. Yoshikawa,T. (2004). [Newly discovered human herpesviruses: pathogenesis and treatments for central nervous system infection due to HHV-6]. Rinsho Shinkeigaku *44*, 849-851.
- 163. Zerr, D.M., Corey, L., Kim, H.W., Huang, M.L., Nguy, L., and Boeckh, M. (2005). Clinical outcomes of human herpesvirus 6 reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. Clin. Infect. Dis. 40, 932-940.
- 164. Zhang, D.H., Cohn, L., Ray, P., Bottomly, K., and Ray, A. (1997). Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. J. Biol. Chem. 272, 21597-21603.
- 165. Zhang,X.B., Li,K., Fok,T.F., Li,C.K., James,A.E., Lam,A.C., Lee,S.M., and Yuen,P.M. (2002). Cobblestone area-forming cells, long-term culture-initiating cells and NOD/SCID repopulating cells in human neonatal blood: a comparison with umbilical cord blood. Bone Marrow Transplant. *30*, 557-564.
- 166. Zheng, W. and Flavell, R.A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. Cell 89, 587-596.
- 167. Zhou,M., Ouyang,W., Gong,Q., Katz,S.G., White,J.M., Orkin,S.H., and Murphy,K.M. (2001). Friend of GATA-1 represses GATA-3-dependent activity in CD4+ T cells. J. Exp. Med. *194*, 1461-1471.

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei folgenden Personen bedanken...

-Prof. Dr. Siegert für die Unterstützung und Betreuung und die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren.
-Dr. Andreas Nitsche für seinen Enthusiasmus, seine Neugier, seine strukturierte Betreuung, interessante Diskussionen und den ab und zu nötigen Schubs, damit auch ich nicht aufgebe.
-meinen "Labormäuse" Delia Barz, Aleksandar Radonic und Dr. Stefanie Thulke, die immer für mich da waren, mir bei allen Fragen mit Rat und Tat zur Seite standen, mich über die Jahre bis zum letzten Wort der Arbeit stets herzlich betreuten und sogar gute Freunde geworden sind.
-PD Dr. Andreas Pahl für die gute und fachlich kompetente Zusammenarbeit in diesem Kooperationsprojekt.
-meinen Eltern Ingrid und Günther, die mich über lange Zeit immer wieder erneut motiviert und ermutigt haben, das Ganze durchzuziehen und den Mut nicht zu verlieren.
- ...und besonders meinem geliebten Mann Philipp, der mich in den typischen Frustrationsphasen der Doktorarbeit unterstützte, mich trotz fehlendem Doktortitel geheiratet und mir zum Fertigstellen der Arbeit unseren kleinen Sohn Maximilian abgenommen hat.

8. Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

03/01	Poster: Nitsche, A., Zhang, M., Clauss, T., Wittig, B., Siegert, W., Brune, K.,
	and Pahl, A. (2001). Cytokine profiles of Cord and Adult Blood:
	Differences in mRNA expression. 27 th Annual Meeting European Group
	for Blood and Marrow Transplantation, Maastricht, Abstract #P464

Paper: Nitsche, A., Zhang, M., Clauss, T., Siegert, W., Brune, K., and Pahl, A. (2007). Cytokine profiles of cord and adult blood leukocytes: differences in expression are due to differences in expression and activation of transcription factors. BMC. Immunol. 8, 18.

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Bei der Verfassung der Dissertation wurden keine anderen als die im Text aufgeführten Hilfsmittel verwendet.

Ein Promotionsverfahren zu einem früheren Zeitpunkt an einer anderen Hochschule oder bei einem anderen Fachbereich wurde nicht beantragt.