

A. Einleitung

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen und bilden die permanente Quelle für die Entstehung neuer Zellen. Außergewöhnlich ist ihre Fähigkeit, entweder zu Vorläuferzellen reiferer Zellen zu differenzieren oder sich selbst zu erneuern, d.h. eine Stammzelle zu werden. Diese Eigenschaft rückt Stammzellen zur Zeit in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Die Pluripotenz von Stammzellen könnte beim Organersatz und der Therapie maligner Erkrankungen nützlich sein.

So weit man weiß, entstehen aus der hämatopoetischen Stammzelle alle Blutzellen, z.B. T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, Megakaryozyten und Erythrozyten. Sie ist also Grundlage des menschlichen Immunsystems. Daß dieser Vorgang sehr komplex ist und erst in Ansätzen verstanden wird, ist nur zu verständlich. Faktoren die bestimmen, wann eine Stammzelle zu Vorläuferzellen differenziert oder sich selbst erneuert, sind noch nicht bekannt. Gerade wegen dieser Komplexität führen Störungen oder Fehlfunktionen dieses Systems immer zu malignen Erkrankungen. Eine Möglichkeit der Therapie ist die Knochenmark-Transplantation, bei der nach Möglichkeit die malignen Stamm- oder Vorläuferzellen vollständig gegen gesunde, funktionsfähige Stammzellen ausgetauscht werden. Diese neuen Stammzellen repopulieren das Knochenmark und führen im Idealfall zur Bildung eines neuen, voll funktionsfähigen Immunsystems.

Der Erfolg dieser Therapie ist häufig durch Herpesviren beeinträchtigt. 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. Die Folgen einer Reaktivierung des humanen Cytomegalievirus waren bis vor kurzem bei Patienten nach Knochenmark-Transplantation eine häufige Todesursache. Für das humane Herpesvirus 6 wird ein Zusammenhang vermutet, konnte jedoch noch nicht sicher gezeigt werden. Diese Arbeit soll einen Beitrag zur Klärung des Einflusses von HHV-6 auf die hämatopoetische Stammzelle und damit die humane Hämatopoese leisten.

I. Viren

Viren sind eine eigenständige Klasse von Infektionserregern, die sich in ihrem Aufbau, ihrer Funktionsweise und ihrem Vermehrungszyklus grundlegend von allen anderen Pathogenen unterscheiden. Die klassische Virusdefinition von Löffler und Frosch nach welcher Viren ultrafiltrierbare, sehr kleine und nicht anzüchtbare Agenzien sind, wurde mit zunehmender Kenntnis über die Natur der Viren immer unzureichender (Löffler, 1998). Es stellte sich heraus, daß auch kleine Bakterien wie Rickettsien und Mykoplasmen diese Kriterien erfüllen können. Heute werden Viren durch drei Kriterien, orientiert an der Definition von Leben, definiert, die in Tabelle 1 aufgelistet sind.

Tabelle 1: Definition von Viren, nach (Brandis, 1994)

Kriterium...	...bezieht sich auf...
Viren enthalten nur einen Typ von Nukleinsäuren, entweder DNA oder RNA.	virale Erbinformation
Viren weisen keine zelluläre Organisation auf; sie haben keine Organellen, wie z. B. Mitochondrien oder Ribosomen, besitzen keine Enzymsysteme zur Energiegewinnung und auch keinen Photosyntheseapparat.	Aufbau von Viruspartikeln
Viren vermehren sich nicht durch Wachstum und anschließende Teilung; die Synthesemaschine der infizierten Zelle produziert auf Anweisung der genetischen Informationen des Virus die einzelnen Virusbestandteile, die dann zum kompletten Viruspartikel (Virion) zusammengebaut werden.	viralen Reproduktionszyklus

Viren sind kleiner als Bakterien; sie messen zwischen 17 nm (Circoviren) und 300 nm (Pockenviren). Eine Ausnahme bilden die Filoviren, bei denen einzelne Ebolavirus-Partikel über 10 µm lang werden können. Die unterschiedlichen Virusfamilien besitzen eine jeweils spezifische Morphologie, die sich auf die grundlegenden Symmetrieformen Helix und Ikosaeder zurückführen läßt.

Bei der Morphogenese der Ikosaederviren fügen sich zunächst die einzelnen asymmetrischen Virusstrukturproteine durch Selbstorganisation zu morphologisch definierten Untereinheiten, den Kapsomeren, zusammen. Die Kapsomere bilden in definierter Stöchiometrie das Gesamtkapsid: Ikosaederviren zeigen 20 Flächen mit 30 Kanten; sie besitzen 12 ECKKapsomeren mit 5er-Rotationssymmetrie (Pentons) und einer für die jeweiligen Virusfamilien typischen Zahl an dazwischen liegenden Kapsomeren mit 6er-Symmetrie (Hexons). Neben dieser geraden Symmetrie (Adeno- und Herpesvirus) zeigen verschiedene andere Virusfamilien eine schiefe Symmetrie (Papilloma- und Calicivirus). Die symmetrische Anordnung von Penton- und Hexonstrukturen auf dem Kapsid kann in hochaufgelösten

elektronenmikroskopischen Aufnahmen klar erkannt, in Grenzbereichen auch durch weiterführende Strukturanalyse verifiziert werden.

Die Einheit aus viraler Nukleinsäure und Kapsid wird als Nukleokapsid bezeichnet. Die äußere Abgrenzung des Nukleokapsids besteht aus Lipiden, Proteinen und Kohlenhydraten und ist von der zellulären Plasmamembran oder von Membranen cytoplasmatischer Organellen abgeleitet. Sie wird während der Freisetzung des Nukleokapsids aus der infizierten Zelle gebildet (Budding-Prozeß). Weitere charakteristische virale Strukturen sind Oberflächenfortsätze (Peplomeren, Spikes, Knobs, Antennen bei nackten Viren) und virusspezifische Innenstrukturen (Core: mit viralem Strukturprotein assoziierte Nukleinsäure) (Fields, 1996).

Gegenwärtig werden vom International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) insgesamt 71 Virusfamilien mit 9 Subfamilien, 164 Gattungen und über 3500 Arten bei Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Tieren taxonomisch unterschieden. Dabei sind die animalen Viren in 25 Familien unterteilt. Für die ICTV-Klassifizierung sind morphologische so wie molekularbiologische Kriterien die entscheidenden taxonomischen Merkmale (Murphy, 1995).

II. Die Familie der *Herpesviridae*

Herpesvirusinfektionen gibt es beim Menschen und zahlreichen Wirbeltierarten, wie zum Beispiel bei Affen, Katzen, Fröschen und Fischen. Trotz stark variierender Symptome gleichen sich bei allen Vertretern dieser Virusfamilie die Partikelmorphologie und die biologischen Eigenschaften (Modrow, 1997). Der Name der *Herpesviridae* leitet sich vom griechischen Wort *herpein*, kriechen, ab und deutet vermutlich auf die kriechende Ausbreitung des von Herpes-Simplex verursachten Hautausschlages hin.

Ein wichtiges charakteristisches Merkmal aller Herpesviren ist ihre Fähigkeit, nach der Primärinfektion latent im Organismus zu persistieren. Dabei werden keine infektiösen Partikel produziert und die infizierte Zelle ist in ihrem Reproduktionsvermögen nicht beeinträchtigt. Das Virus kann jedoch wiederholt aus dem Zustand der Latenz reaktiviert werden und in den lytischen Infektionszyklus eintreten, dessen Folge der Tod der Wirtszelle ist (Roizman, 1996).

Bisher sind 8 humane Vertreter der Familie der *Herpesviridae* bekannt. Sie lassen sich auf Grund ihrer Pathogenität, des Zell-Tropismus und ihrer Reproduktionseigenschaften den drei in Tabelle 2 gezeigten Unterfamilien zuordnen.

Tabelle 2: Klassifizierung humaner Herpesviren

Unterfamilie	Genus	Humanpathogener Vertreter
<i>a-Herpesvirinae</i>	Simplexvirus	Herpes-Simplex-Virus 1 (HHV-1, HSV-1)
		Herpes-Simplex-Virus 2 (HHV-2, HSV-2)
	Varicellavirus	Varizella-Zoster-Virus (HHV-3, VZV)
<i>b-Herpesvirinae</i>		Humanes Cytomegalievirus (HHV-5, HCMV)
	Cytomegalievirus	Humanes Herpesvirus 6 (HHV-6)
	Roseolovirus	Humanes Herpesvirus 7 (HHV-7)
<i>g-Herpesvirinae</i>	Lymphocryptovirus	Epstein-Barr-Virus (HHV-4, EBV)
	Rhadinovirus	Humanes Herpesvirus 8 (HHV-8)

modifiziert nach (Modrow, 1997)

Die Mitglieder der *a-Herpesvirinae* zeichnen sich durch ein breites Wirtsspektrum und einen mit 8-14 Stunden kurzen Replikationszyklus aus. In Zellkultur breiten sie sich schnell aus. Ort der Persistenz *in vivo* sind sensorische Ganglien. *b-Herpesvirinae* besitzen ein enges Wirtsspektrum, breiten sich in Zellkultur nur langsam aus und haben einen vergleichsweise langen Replikationszyklus von 48-96 Stunden. Infizierte Zellen zeigen durch eine deutliche Vergrößerung einen cytopathischen Effekt (CPE). Die *g-Herpesvirinae* besitzen im allgemeinen ein enges Wirtsspektrum und mit 36-60 Stunden einen relativ langen Replikationszyklus.

III. Das Humane Herpesvirus 6

Das Humane Herpesvirus 6 (HHV-6) wurde 1986 bei der Leukozyten-Kultivierung von Patienten mit lymphoproliferativen Defekten entdeckt (Salahuddin, 1986). Dabei beobachtete man einen CPE, der sich auf mononukleäre Zellen des Nabelschnurblutes übertragen ließ. Als auslösendes Agens dieses CPE wurde ein Virus mit Herpesvirus-Morphologie identifiziert, welches aufgrund des beobachteten Tropismus als Human B-Lymphotropic Virus (HBLV) bezeichnet wurde. Später zeigte sich jedoch, daß dieses Virus bevorzugt T-Lymphozyten infiziert und dort auch repliziert. Diese Tatsache führte zur Umbenennung des Virus in Humanes Herpesvirus Typ 6.

III.1 Varianten

Beim Vergleich verschiedener HHV-6 Isolate zeigten sich Unterschiede hinsichtlich des Zell-Tropismus *in vitro*, der DNA Sequenz, der Reaktivität mit monoklonalen Antikörpern, der Sero-Epidemiologie und der Assoziation mit verschiedenen

Krankheitsbildern (Di Luca, 1996; Braun, 1997). Alle bisher gefundenen HHV-6 Isolate lassen sich eindeutig in zwei Gruppen einteilen, welche als HHV-6A und HHV-6B bezeichnet werden. Beide Gruppen sind genetisch eng verwandt, so unterscheiden sie sich auf DNA-Ebene in einigen Bereichen nur um 1-3%, während der Unterschied in anderen Bereichen 25% betragen kann. Die Genome von HHV-6A und HHV-6B sind kollinear (Dominguez, 1999; Isegawa, 1999).

Isolate der Gruppe A lassen sich bevorzugt auf T-Zelllinien vermehren und zeigen *in vitro* einen stark ausgeprägten CPE. Infizierte Zellen degenerieren schneller und entlassen Viruspartikel in den Überstand. HHV-6B Isolate lassen sich am besten in frischen, Mitogen stimulierten, Nabelschnurblut-Lymphozyten (*engl.* CB-MNC) propagieren und liegen vermehrt zellassoziiert vor (Frenkel, 1990; Wyatt, 1990). In Tabelle 3 sind die Eigenschaften der HHV-6 Varianten vergleichend gegenübergestellt.

Tabelle 3: Gegenüberstellung der HHV-6 Varianten A und B

Charakteristikum	HHV-6A	HHV-6B
Wachstumseigenschaften	primäre stimulierte Lymphozyten und T-Zelllinien	nur primäre stimulierte Lymphozyten
Restriktions-Muster	teilweise verschieden von B	teilweise verschieden von A
Antigen-Profil	Reaktion mit mAb gegen gp82-105 und p180	keine Reaktion mit mAb gegen gp82-105 und p180, dafür mit mAb gegen p101
Cytopathogenität	<i>in vitro</i> virulenter, lytisch	weniger virulent, zellgebunden
Assoziierte Krankheiten	Primärerkrankung unklar	Drei-Tage-Fieber, häufiger reaktiviert unter Immunsuppression
Vertreter	GS, CO3, CO5, CO8, U1102	DC, BA, OK, SF, Z29, R104

modifiziert nach (Mackay, 2000)

III.2 Aufbau der Viruspartikel

Ein HHV-6 Virion hat einen Durchmesser von ~200 nm und besteht aus ~30 Strukturproteinen. Im Dünnschnitt erkennt man vier konzentrische Schichten: Das Core (*engl.* Kern), umgeben vom Nukleokapsid, das Tegument und die Virushülle. Das Core ist eine fibrilläre Proteinmatrix, die mit dem doppelsträngigen linearen Genom assoziiert ist, vergleichbar mit Histonen. Es ist von einem ikosaedrischen Nukleokapsid umgeben, welches aus 162 Kapsomeren (12 Pentamere und 150 Hexamere) besteht und einen Durchmesser von 100 nm besitzt. Das Nukleokapsid

umgibt eine amorphe, globuläre Proteinmatrix, welche als Tegument bezeichnet wird und ein Charakteristikum der *Herpesviridae* ist. Die Funktion des Teguments ist noch nicht vollständig bekannt, vermutlich haben die darin angesiedelten Proteine regulatorische Funktion (Lopez, 1993). Als äußere Abgrenzung des Herpesvirions dient die Virushülle. Sie enthält sogenannte Glykoprotein-Spikes, welche als antigene Determinante bei der Bildung von Antikörpern gegen HHV-6 eine wichtige Rolle spielen. Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung und gegenübergestellt die elektronenmikroskopische Aufnahme von vier HHV-6A Virionen.

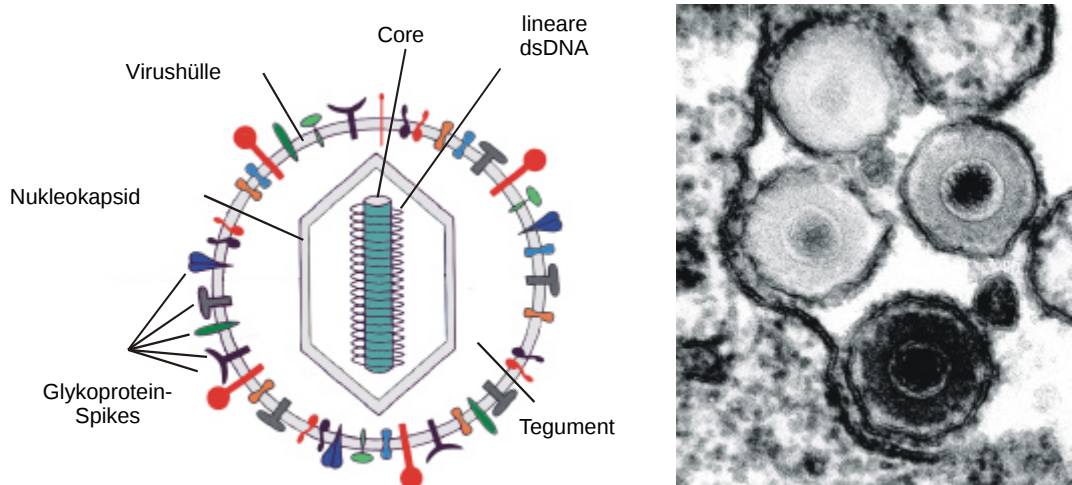


Abbildung 1: Schematische und elektronenmikroskopische Darstellung eines HHV-6A Virions. Die Schematische Abbildung ist modifiziert nach (Modrow, 1997), die EM-Aufnahme wurde von Dr. S. Biel, Robert Koch-Institut angefertigt.

III.2.1 Morphogenese

Die Infektion der Zielzelle erfolgt durch rezeptorvermittelte Endocytose (Cirone, 1992). Der HHV-6 Rezeptor war lange Zeit unbekannt. Erst kürzlich konnte CD46 als Rezeptor für HHV-6 identifiziert werden (Santoro, 1999). Einerseits wird die HHV-6 Infektion durch CD46 spezifische monoklonale Antikörper (mAb) inhibiert, andererseits lassen sich ursprünglich infektions-resistente Nager-Zellen nach Transfektion von humanem CD46 mit HHV-6 infizieren. Da nicht alle untersuchten Zelllinien zu einer produktiven Infektion führen, wird über weitere, für eine Virusvermehrung erforderliche Faktoren diskutiert. CD46 wird auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert und zählt zur Gruppe der RCA Proteine (*engl.* Regulator of Complement Activation) (Seya, 1995). Ein ubiquitär exprimierter Rezeptor könnte auch das breite Spektrum von HHV-6 infizierbaren Zellen erklären.

Das Nukleokapsid gelangt ins Cytoplasma, wird vom Tegument getrennt und lagert sich an die Mikrotubuli, woran es zu den Kernporen transportiert wird. Anschließend

wird das Genom durch die Kernporen ins Nukleoplasma entlassen. Kapsidproteine assemblieren zuerst zu leeren Kapsiden und werden erst dann mit DNA gefüllt, wobei neue Nukleokapside entstehen. Die weitere intrazelluläre Reifung von HHV-6 Virionen unterscheidet sich von der anderer Herpesviren. Zuerst erfolgt an der inneren Kernmembran das Envelopment, die Umhüllung des Nukleokapsids, wobei diese Hülle keine Glykoproteine enthält. Die umhüllten Nukleokapside knospen unter Verlust der Hülle in spezielle Cytoplasma-Invaginationen in den Kern, die Tegusomen, wo sie das Tegument erhalten. An cis-Golgi Cisternae erfolgt ein Re-Envelopment und erst jetzt werden die umhüllten Virionen in Transportvesikeln durch Wechselwirkungen mit dem Golgi Apparat sequentiell glykosyliert (Cirone, 1994; Torrisi, 1999). Reife Virionen werden durch Exocytose aus den Zellen in den extrazellulären Raum entlassen.

Erst kürzlich wurden Strukturen in HHV-6 infizierten Zellen gefunden, welche als "annulate lamellae" bezeichnet und als möglicher Ort des Re-Envelopments nach dem Erhalt des Teguments diskutiert werden (Torrisi, 1999).

III.2.2 Das HHV-6 Genom

Das HHV-6 Genom besteht aus einer linearen doppelsträngigen DNA (dsDNA) von ~167 kb mit einem GC-Gehalt von 43% (HHV-6A Stamm U1102) (Gompels, 1995). Die Enden der linearen DNA sind von ~10 kb langen terminalen Wiederholungssequenzen flankiert und schließen eine einheitliche Region von ~142 kb ein. Das Genom kodiert für ~70 Proteine, von denen bisher Polypeptide von 31-180 kD und Glykoproteine von 54-125 kD bekannt sind. Bei der Infektion wird die lineare DNA zirkularisiert und liegt dann episomal im Kernplasma vor. Dabei gelangen die für Verpackung notwendigen Sequenzen *pac-1* und *pac-2* in unmittelbare Nähe. In Einzelfällen ist die Integration des HHV-6 Genoms in das Wirtsgenom beschrieben worden (Torelli, 1995; Luppi, 1993).

Die Expression des Virusgenoms erfolgt in einem kaskadenartig regulierten Zyklus, bei dem zuerst "immediate-early" (*engl.* sehr früh) Proteine synthetisiert werden. Sind diese dann in den Kern transportiert, kontrollieren sie die Synthese der "early" (*engl.* früh) Gene, deren Produkte für die DNA Replikation benötigt werden. Diese erfolgt im Zellkern der infizierten Zelle mit Hilfe viraler DNA-Polymerasen nach dem Mechanismus des "rolling circle". Im Laufe der Replikation induzieren early Proteine dann die Synthese von late (*engl.* spät) Genen, welche für Strukturproteine kodieren und an der Morphogenese des Virions beteiligt sind.

III.3 HHV-6 Effekte auf die Wirtszelle

Die offensichtlichste Veränderung HHV-6 infizierter Zellen ist die aufgeblasene, refraktile Morphologie mit dem gelegentlichen Auftreten multinukleärer Zellen (Syncytien), welche nach 3-5 Tagen in der Kultur sichtbar werden können. Vermutlich hängt dieser CPE mit der HHV-6 bedingten Induktion einer Vielzahl von zellulären Proteinen und der Desintegration des Cytoskeletts zusammen (Black, 1992). Die zelluläre DNA Synthese kann drastisch abnehmen (Di Luca, 1990).

HHV-6A induziert in einem replikationsunabhängigen Prozeß die Expression von CD4 in CD3⁻CD4⁻CD8⁻ Lymphozyten-Populationen, auch UV bestrahlte und damit replikationsunfähige Viren induzieren diesen Effekt (Lusso, 1991a). In einem replikationsabhängigen Prozeß dagegen kommt es nach HHV-6 Infektion zur Reduzierung der CD3/TCR Expression, wobei der durch HHV-6B hervorgerufene Effekt geringer ist als der durch HHV-6A (Lusso, 1991b).

Kürzlich konnte gezeigt werden, daß HHV-6 auf Transkriptionsebene die Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 inhibiert (Yasukawa, 1999a). Dies ist insofern wichtig, als CXCR4 offensichtlich eine wichtige Rolle in der humanen Hämatopoese zu spielen scheint. Des weiteren manipuliert HHV-6 die Produktion einer Reihe von Cytokinen, worauf später noch intensiver im Zusammenhang zur Myelosuppression eingegangen werden soll.

III.4 Wechselwirkungen mit anderen Viren

Obwohl EBV-positive Zelllinien effizienter von HHV-6 infiziert werden als EBV-negative Zelllinien und Wechselwirkungen mit HCMV und HHV-7 beschrieben wurden, ist doch die Interaktion von HHV-6 mit HIV am intensivsten untersucht worden (Fairfax, 1994; Sieczkowski, 1995).

HHV-6 und HIV können CD4⁺ Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* simultan infizieren. Abhängig von den Kulturbedingungen kann HHV-6 dabei einen inhibierenden oder stimulierenden Effekt auf die HIV-Replikation haben, wobei die HHV-6 Replikation selbst dabei nicht beeinträchtigt ist. Da HHV-6 zu einer Induktion der CD4 Expression und damit gleichzeitig zu einer Erhöhung der Anzahl von HIV-Rezeptormolekülen führt, wurde lange Zeit angenommen, daß HHV-6 maßgeblich für die teilweise sehr unterschiedlichen Verläufe von HIV-Infektionen bis hin zur Erkrankung AIDS verantwortlich sein könnte.

III.5 Epidemiologie

Die Seroprevalenz von HHV-6 liegt im Alter von 13 Monaten bereits in einem Bereich von 64% bis 83%. Bei Neugeborenen findet man hohe Titer maternaler HHV-6 spezifischer Antikörper, welche nach 3-6 Monaten unter die

Nachweisbarkeitsgrenze absinken. Meist schon wenige Monate später kommt es dann im Laufe der Primärinfektion zu einem starken Anstieg von anti-HHV-6-Antikörpern, welche in den meisten Fällen lebenslang nachweisbar bleiben (Campadelli, 1999).

Am häufigsten findet die Übertragung durch den Speichel der Mutter auf das Kind statt (Harnett, 1990). Dabei scheint es sich jedoch ausschließlich um HHV-6B zu handeln, da HHV-6A noch nicht in Speichelproben nachgewiesen werden konnte. Die Prävalenz von HHV-6 DNA im Speichel liegt je nach verwendeter Nachweismethode zwischen 90% und 3% (Cone, 1994). Dabei waren trotz lediglich 3% positiver Speichelproben 63% der untersuchten Speicheldrüsen HHV-6 DNA positiv, was darauf schließen läßt, daß sich bei den Speicheldrüsen um einen möglichen Ort der latenten HHV-6 Infektion handelt (Di Luca, 1995).

III.6 Klinik und Pathogenese

HHV-6 galt nach seiner Entdeckung als "virus in search of a disease". Erst 2 Jahre nach dessen Isolierung konnte eine eindeutig mit der HHV-6B-Primärinfektion assoziierte Erkrankung identifiziert werden. Dabei handelt es sich um das Drei-Tage-Fieber (roseola infantum, exanthema subitum), welches als akute fiebrige Erkrankung von Kindern im Alter von 6-12 Monaten bekannt ist (Asano, 1994). Neben hohem, kaum therapierbarem Fieber kann begleitend ein Exanthem auftreten. In vielen Fällen kann die Primärinfektion jedoch auch asymptomatisch verlaufen. Mit einer HHV-6A-Infektion konnten bisher keine Erkrankungen direkt korreliert werden, obwohl HHV-6A DNA vermehrt im Zusammenhang mit neurologischen Erkrankungen nachgewiesen wurde (Wilborn, 1994a; Suga, 1993).

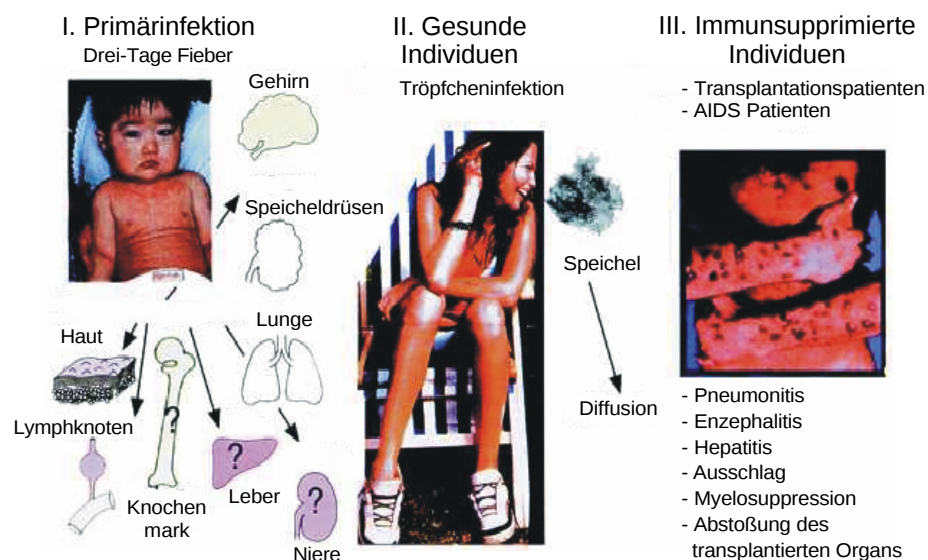


Abbildung 2: Pathogenese von HHV-6 (modifiziert nach Campadelli, 1999).

Nach der Primärinfektion persistiert das Virus in gesunden Kindern und Erwachsenen in deren Lymphozyten, Monozyten und verschiedenen Geweben (Abb. 2 I). Vermutlich repliziert HHV-6B auch in gesunden Menschen aktiv in den Speicheldrüsen. Eine Reaktivierung in immunkompetenten Personen verläuft für gewöhnlich asymptomatisch (Abb. 2 II).

In Immunsupprimierten, z.B. bei Patienten mit AIDS, oder iatrogen nach Organtransplantation, kann eine Infektion oder Reaktivierung aus der Latenz zu ernsthaften Komplikationen führen (Singh, 1996). Dazu gehören Pneumonitis, Enzephalitis, Enzephalopathie, Hepatitis, Fieber, Ausschlag und häufig eine Abstoßung des transplantierten Organs, dessen Folge den Tod für den Patienten bedeuten kann (Kadokia, 1996; Cone, 1999). Vor allem eine Myelosuppression, mit zum Teil bedrohlichem Absinken der Leukozyten- und Thrombozyten-Zahlen im peripheren Blut, ist eine Komplikation, die nach Knochenmark-Transplantation und der in diesem Zusammenhang verabreichten immunsuppressiven Therapie nicht selten beobachtet wird (Abb 2 III). Zugeschrieben werden diese Veränderungen dem aus dem Zustand der Latenz reaktivierten HHV-6 und seinem Verwandten, dem humanen Cytomegalievirus (HCMV).

III.6.1 HHV-6 und Myelosuppression

Eine Vielzahl nur indirekter Hinweise spricht für eine Beteiligung von HHV-6 an der Genese der Myelosuppression. So zeigten klinische Studien, daß die idiopathische Myelosuppression bei knochenmark-transplantierten Patienten, d.h. nach Ausschluß anderer Gründe von Transplantatversagen einschließlich HCMV Infektion, häufiger bei Patienten mit gleichzeitig nachweisbarer HHV-6 Virämie vorkommt, als bei Patienten ohne HHV-6 Virämie (Carrigan, 1994; Drobyski, 1993; Rosenfeld, 1995).

In vivo konnte HHV-6 in Vorläuferzellen des Knochenmarks von Patienten mit latenter HHV-6 Infektion nachgewiesen werden (Luppi, 1999). *In vitro* Versuche zeigen, daß HHV-6 Infektion von mononukleären Zellen des Knochenmarks eine signifikante Verminderung der Koloniebildung (CFU-GM, CFU-GEMM, BFU-E, siehe A.IV.1.2) sowie des Stromazellwachstums zur Folge haben (Isomura, 1997; Knox, 1992; Carrigan, 1995). In ähnliche Richtung, d.h. Hemmung der Differenzierung oder Proliferation, geht die Beobachtung, daß HHV-6 die Bildung und Proliferation von Makrophagen aus Knochenmarkzellen mit GM-CSF und IL-3 nahezu vollständig unterdrückt (Burd, 1993).

Weiter führte HHV-6 Infektion bei mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PB-MNC) zu einer Reduktion der OKT3 oder Phytohämagglutinin (PHA) stimulierten IL-2 Sekretion (Flamand, 1996). Die Beobachtungen, daß PB-MNC

nach Infektion die Bildung von Interferon- α , Interleukin-1 β und Tumor-Nekrosefaktor- α induzieren, unterstützen die Vorstellung, daß eine Myelosuppression auf indirektem Wege über eine von HHV-6 veränderte Cytokin-Sekretion bewirkt wird (Flamand, 1991; Flamand, 1991; Kikuta, 1990). Interessanterweise ist für diesen Effekt infektiöses Virus nicht erforderlich, UV-inaktiviertes Virus hat die gleiche Wirkung.

Vom nahe verwandten HCMV ist bekannt, daß es die Stromazellen des Knochenmarks infiziert. Es kann also entweder auf direktem Weg oder durch ein verändertes Cytokin-Muster, zum Beispiel die Reduktion essentieller Wachstumsfaktoren wie SCF, für eine verminderte Bildung humaner Zellen verantwortlich sein (Lagneaux, 1996; Mayer, 1997; Steffens, 1998). Von HHV-6 ist in diesem Zusammenhang lediglich bekannt, daß es unter anderem HUVEC (*engl.* human umbilical vein endothelial cells) und Fibroblasten chronisch infizieren kann (Wu, 1998; Robert, 1996). Die Folgen dieser Infektion sind noch unbekannt.

III.7 Nachweis von HHV-6

Gerade weil die Pathogenität von HHV-6 noch nicht vollständig aufgeklärt ist, sind sensitive Nachweismethoden für dieses Virus mehr und mehr erforderlich geworden. Als Gold-Standard für den Nachweis von Viren gilt generell die Zellkultur. Dabei wird das Untersuchungsmaterial, in der Regel PB-MNC oder Blutplasma, mit frisch stimulierten Nabelschnurblut-Mononukleären Zellen (*engl.* cord blood mononuclear cells, CB-MNC) kokultiviert. Nach 5-8 Tagen lassen sich in infizierten Kulturen ein charakteristischer CPE oder mit Hilfe der Immuncytochemie HHV-6 Antigen nachweisen. Obwohl diese Methode eine hohe Spezifität besitzt und unter idealen Bedingungen ein einziges infektiöses Viruspartikel nachweisen kann, sowie dabei Virusmaterial für weitere Charakterisierungen produziert, ist sie doch auf Grund des hohen experimentellen Aufwandes und der langen Zeitspanne zwischen der Gewinnung des klinischen Materials bis zur sicheren Diagnose in der klinischen Diagnostik nicht anwendbar.

Tabelle 4: Nachweismethoden für HHV-6

Technik	Nachweis von	Sensitivität	Dauer
Zellkultur	infektiösen Partikeln	hoch (1 infektiöses Virus)	2-14 d
ELISA	Virusantigen / Antikörper	mittel	2-3 h
IFA, APAAP	Virusantigen / Antikörper	hoch	2-8 h
PCR	Teile viraler Genome	hoch (1-100 Moleküle)	1-4 h
EM	Viruspartikeln	niedrig (10^7 /mL)	15 min

Die Serologie, das heißt der Nachweis HHV-6 spezifischer IgM oder IgG Antikörper im Blut mit einem ELISA, ist nur begrenzt aussagekräftig. Während die serologische Untersuchung von Kindern mit Drei-Tage-Fieber zeigte, daß ein IgM Antikörperanstieg erst 3-5 Tage nach dem Erscheinen erster Symptome nachweisbar war, und damit keine rechtzeitige Diagnose zuläßt, beschreiben andere Arbeiten die quantitative Bestimmung von IgG Antikörpern zum Nachweis einer HHV-6 Infektion (Chiu, 1998; Sloots, 1996). Da die Durchseuchung mit HHV-6 jedoch sehr hoch ist, sollte die auf der Serologie basierende Diagnostik differenziert betrachtet werden. Der Nachweis HHV-6 spezifischer Proteine mit Hilfe mikroskopischer Techniken, wie IFA oder APAAP, hat zur Zeit auf Grund einer geringen Sensitivität in der HHV-6 Diagnostik nur begrenzten Wert (Nitsche, 2000a).

Mit Einzug der Polymerase Kettenreaktion (*engl.* polymerase chain reaction, PCR) in die klinische Diagnostik wurde der Nachweis von HHV-6 DNA zu einer interessanten Alternative (Wilborn, 1994b). Durch die PCR wurde die Nachweisgrenze drastisch gesenkt, manche PCR Methoden detektieren 1 Genomequivalent pro Test (*engl.* Assay). Vor allem aber wurden der methodische Aufwand und die Zeit bis zu einem verlässlichen Ergebnis stark reduziert. Doch leider zeigte sich, daß gerade wegen der hohen Sensitivität der qualitative DNA Nachweis mit der PCR problematisch ist, denn sie erlaubt nicht die Unterscheidung einer latenten Infektion vieler Zellen von einer aktiven Infektion weniger Zellen. Um dieses Problem zu umgehen, wurde zuerst der Nachweis von HHV-6 DNA in zellfreiem Material, zum Beispiel im Plasma als Indikator einer aktiven Virusreplikation herangezogen (Secchiero, 1995). Eine bessere Möglichkeit zur Unterscheidung von latenter und aktiver HHV-6 Infektion bietet jedoch die quantitative PCR, da man mit dieser Methode Entwicklungen der Viruslast verfolgen kann und dadurch leicht eine fortschreitende Virusvermehrung zu erkennen ist. Zahlreiche quantitative PCR Methoden sind in den letzten Jahren entwickelt worden (Clark, 1996; Ohyashiki, 1999; Osioy, 1998). Sie alle erfordern einen relativ großen Arbeitsaufwand und sind deshalb für die Routinediagnostik eher ungeeignet. Vermutlich ist es diesem Umstand zuzuschreiben, daß es zur Zeit noch keine Daten über eine für den immunsupprimierten Patienten kritische und damit therapiepflichtige Viruslast gibt.

III.8 Therapie

Weder für die Prophylaxe noch für die Therapie von HHV-6 sind zur Zeit Medikamente im Einsatz. Ein großes Problem ist der differentialdiagnostische Nachweis einer HHV-6 Infektion. Ein Fallbericht beschreibt die erfolgreiche

Behandlung HHV-6 assoziierter neurologischer Symptome mit Foscarnet (Phosphonoameisensäure) (Bethge, 1999). Die Verabreichung von Foscarnet führte zum Abklingen der neurologischen Symptome und zur Abnahme der HHV-6B Last im Liquor des Patienten. Foscarnet bindet an die Pyrophosphat Bindungsstelle der viralen DNA Polymerase und konkurriert so mit dem natürlichen Substrat. Es wird in der klinischen Praxis als Virostatikum gegen HCMV verwendet.

IV. Die humane Hämatopoese

Hämatopoese leitet sich vom Griechischen aus *haima*, Blut und *poiesis*, Bildung ab. Die Hämatopoese findet beim Embryo im Knochenmark, der Leber und der Milz, im gesunden Erwachsenen ausschließlich im Knochenmark statt. Sie kann jedoch in Assoziation mit bestimmten Krankheiten auch extramedullär, d.h. in der Milz und der Leber Erwachsener wieder aufgenommen werden. Hämatopoetisch aktive Strukturen sind durch ein Netzwerk von Stromazellen gekennzeichnet, in welche die Blut-bildenden Zellen eingebettet sind. Morphologisch unterscheidbare Gebiete aktiver Hämatopoese werden als "Cobblestone area" (*engl.* Kieselstein) bezeichnet (COPE Dictionary, 1999). Alle gebildeten Blutzellen leiten sich dabei von einer Zelle ab, die als pluripotente hämatopoetische Stammzelle bezeichnet wird. Bei diesem Prozeß spielt das Micro-Environment, das Stroma, eine entscheidende und noch nicht gänzlich geklärte Rolle. Offensichtlich hängt die Bildung der verschiedenen Blutzell-Reihen entscheidend davon ab, daß hämatopoetisch aktive Wachstumsfaktoren in der richtigen Konzentration zur rechten Zeit vorhanden sind. Vermutlich ist die Produktion dieser Wachstumsfaktoren die wichtigste Aufgabe der Stromazellen (Ibelgauft, 1999). Abbildung 3 zeigt in stark vereinfachter Form eine schematische Darstellung der humanen Hämatopoese.

IV.1 Die hämatopoetische Stammzelle

Das entscheidende Charakteristikum einer hämatopoetischen Stammzelle ist die Fähigkeit, ein hämatopoetisches System zu repopulieren und eine Langzeit-Multilinien-Hämatopoese *in vivo* aufrecht zu erhalten. Das bedeutet, daß diese primitiven Zellen zwei Funktionen erfüllen müssen: 1. Die Selbst-Erneuerung (self-renewal) zur Erhaltung eines Vorrates von Stammzellen und 2. Die Differenzierung in die verschiedenen hämatopoetischen Zellreihen. Deshalb bezeichnet man sie auch als pluripotente hämatopoetische Stammzellen (PHSZ) (Ogawa, 1993). Durch Differenzierung entstehen aus der PHSZ Vorläuferzellen der lymphoiden Zellreihe, B-Zellen und T-Zellen, und der myeloiden Zellreihe, Granulozyten, Monozyten, Thrombozyten und Erythrozyten (siehe Abb. 3). Auf diese Weise entstehen im

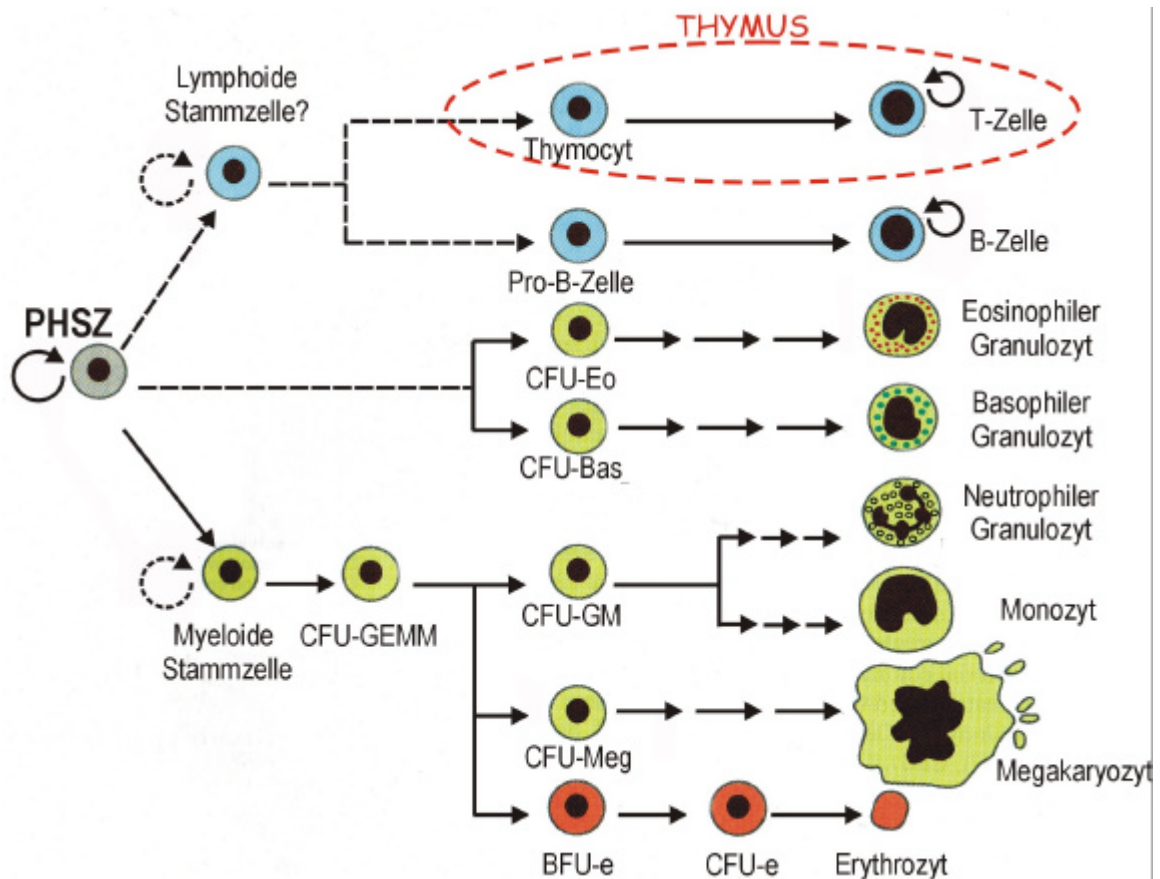


Abbildung 3: Schematische Darstellung der humanen Hämatopoese. PHSZ: Pluripotente hämatopoetische Stammzelle; CFU: Colony forming unit; GEMM: Granulozyten-Erythrozyten-Monozyten-Makrophagen; Eo: Eosinophile; Bas: Basophile; GM: Granulozyten-Monozyten; Meg: Megakaryozyten; BFUe: Burst Forming Unit Erythrozyten

Körper ungefähr 10^9 kernhaltige Blutzellen pro kg Körpergewicht am Tag. Die Kontinuität dieser Zellproduktion und dadurch das Aufrechterhalten eines qualitativen und quantitativen Gleichgewichts, ist essentiell für die Funktion des Immunsystems. Eine Störung dieser Zellproduktion und Differenzierung führt, abhängig vom Reifegrad der defekten Zellen, immer zu malignen Erkrankungen.

Zur Zeit ist noch nicht bekannt, welche phänotypischen Marker die PHSZ genau besitzt. Es galt lange Zeit als wahrscheinlich, daß sie CD34 exprimiert, ein integrales Membranprotein von 90-120 kD. Neuere Arbeiten an PHSZ von Mäusen zeigen, daß CD34 vermutlich als reversibel exprimierter Marker für die Aktivierung von PHSZ anzusehen ist, die ruhende pluripotente Stammzelle exprimiert CD34 dementsprechend nicht (Sato, 1999). Seit kürzerer Zeit werden zusätzlich zu CD34 das AC133 Antigen (jetzt CD13) und der Chemokin-Rezeptor CXCR4 als Marker der PHSZ diskutiert (Yin, 1997). So konnte am *in vivo* Hämatopoese-Modell der NOD/SCID Maus gezeigt werden, daß die Blockierung von CXCR4 mit monoklonalen Antikörpern vor der Transplantation zu einem verminderten Engraftment von PHSZ führt. Wurden die blockierenden Antikörper erst nach der Transplantation der Stammzellen injiziert, nahm der inhibierende Effekt mit der Zeit

bis zur Antikörperinjektion nach Transplantation ab (Peled, 1999). CXCR4 spielt offensichtlich eine wichtige Rolle bei frühen Ereignissen der Knochenmark Repopulation, zum Beispiel dem "Homing", dem selbstständigen Ansiedeln der PHSZ im Knochenmark der NOD/SCID Maus.

Weiter konnte gezeigt werden, daß die Telomerase-Aktivität in $CD34^+ CD38^-$ Zellen aus Nabelschnurblut signifikant niedriger ist als in $CD34^+ CD38^+$ Zellen. Da ruhende Zellen eine geringe Telomerase-Aktivität zeigen, scheint sich die PHSZ in der $CD38^-$ Fraktion der $CD34^+$ Zellen zu befinden (Sakabe, 1998).

Nur eine von 30.000 mononukleären Zellen aus Nabelschnurblut ist nach heutigen Kriterien eine PHSZ und läßt sich als Zelle mit lymphoidem Charakter und variabler Größe charakterisieren (De Bruyn, 2000). Einige phänotypische Marker sind in Tabelle 5 gezeigt.

Tabelle 5: Charakteristische Oberflächenmarker von PHSZ

Molekül	Expression	Bemerkung
CD34	+	Hämatopoetische Vorläuferzellen
CD90/Thy-1	+	Pro-Thymocyten
CD117/c-kit	+	Stammzell Faktor (SCF) Rezeptor
CD38	—	frühe B-und T-Zellen, Plasmazellen
CD71	—/schwach	Transferrinrezeptor, aktivierte Leukocyten
CD45RA	—	naive T-Zellen
HLA-DR	—	Humanes Leukozyten Antigen Klasse II (HLA II)
CD133	+	auf $CD34^{++}$ Zellen
CXCR4	+	Rezeptor für SDF-1 (Stromal Derived Factor-1)
Lin*	—	Linienpezifische Marker (lineage specific)

* Marker bereits linienspezifisch differenzierter Zellen

IV.1.1 Quellen hämatopoetischer Stammzellen

Neben Knochenmark und peripherem Blut (PB) G-CSF mobilisierter Patienten wird seit kürzerer Zeit Nabelschnurblut für die Transplantation verwendet. Das Nabelschnurblut (*engl.* cord blood, CB) kann direkt im Anschluß an die Geburt aus der Nabelvene abgenommen werden, was weder für Mutter noch Kind ein Risiko darstellt. In *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, daß der Anteil unreifer, koloniebildender Zellen (siehe unten) im Nabelschnurblut erheblich höher ist, als im Knochenmark (de Wynter, 1995). Auch im *in vivo* Modell der NOD/SCID Maus wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt. Durch Verdünnungsexperimente, sogenannte "limiting dilution assays", konnte der Anteil der PHSZ in CB auf 1 pro

$9,3 \times 10^5$, in Knochenmark auf 1 pro 1×10^6 und in PB auf 1 pro 6×10^6 bestimmt werden (Mayani, 1998). Neben dem bloßen Anteil an PHSZ scheint auch deren Qualität und Phänotyp in Abhängigkeit von der Quelle unterschiedlich zu sein. So konnten unterschiedliche Adhäsionsmarker und Proliferationsmarker in $CD34^+$ Zellen aus CB, KM und PB nachgewiesen werden (Asosingh, 1998; Holyoake, 1999). Für PHSZ aus CB konnte gezeigt werden, daß diese schneller als PHSZ aus KM von der G0/G1 Phase in den Zellzyklus eintreten können, was ein höheres Proliferations- und Expansionspotential erklären würde (Gothot, 1998). Da bislang die eindeutige Charakterisierung der wirklich pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle noch aussteht, müssen diese Ergebnisse als vorläufig betrachtet werden. Auch aus klinischer Sicht ist die Verwendung von Nabelschnurblut interessant. In den letzten Jahren wurden weltweit über 500 Kinder mit Stammzellen aus Nabelschnurblut transplantiert. Offensichtlich kommt es dabei seltener zur Transplantat gegen Wirt Reaktion (*engl.* graft-versus-host-disease, GvHD), einer Abstoßungsreaktion die vom übertragenen Immunsystem des Spenders, den Blutzellen, gegen den Empfänger gerichtet ist. Ursache dafür könnte der unreifere Zustand der Nabelschnurblutzellen verglichen mit den reifen Zellen des Knochenmarks sein (Broxmeyer, 1995). *In vitro* Studien, die ein verändertes Muster der Cytokin-Expression in CB-MNC zeigen, stützen diese Theorie (Cohen, 1999; Sautois, 1997).

Seit einigen Jahren werden deshalb weltweit Zentren eingerichtet, welche die Sammlung, Lagerung und Typisierung des offensichtlich sehr wertvollen und bislang unwissend verworfenen Nabelschnurbluts zum Ziel haben (Gluckman, 1998). Da die maximalen Zellzahlen für die Transplantation Erwachsener leider nicht ausreichen, wird intensiv an einer möglichen *in vitro* Expansion von PHSZ aus Nabelschnurblut gearbeitet.

IV.1.2 *In vitro* Nachweis hämatopoetischer Stammzellen

Die Quantifizierung von PHSZ wurde lange Zeit in *in vitro* Modellen versucht, bei welchen das proliferative Potential der Zellen in semi-solidem Medium mit definierten Cytokin-Kombinationen evaluiert wurde.

Bei diesen, auch in der klinischen Routine verwendeten Kolonie-bildenden Tests (*engl.* Colony-Forming Unit, CFU), unterscheidet man die verschiedenen Vorläuferzellen durch die charakteristische Morphologie der von ihnen gebildeten Zell-Kolonien. So lassen sich eindeutig Vorläuferzellen von Granulozyten (CFU-G), Erythrozyten (CFU-E), Makrophagen (CFU-M) und Granulozyten-Makrophagen (CFU-GM) sowie deren unreifere Vorläuferzellen (CFU-GEMM) identifizieren. Diese Tests erfassen jedoch bereits linienspezifisch geprägte Zellen ohne langzeit-

repopulierendes Potential. Die unreifste Vorläuferzelle, die in *in vitro* Experimenten nachgewiesen werden kann, ist die LTC-IC (Long-Term Culture Initiating Cell) (McNiece, 1989; Sutherland, 1989; Ibelgauf, 1999). Während diese Zelle im System der murinen Hämatopoese offensichtlich langzeit-repopulierendes Potential zu besitzen scheint, ist dieser Zusammenhang für die humane Hämatopoese bisher nicht nachweisbar.

Einen großen Fortschritt, verglichen mit den beschriebenen *in vitro* Methoden, stellte die Einführung von Xeno-Transplantat-Modellen in immundefizienten Mäusen dar. Diese lassen Untersuchungen der Hämatopoese und der primitivsten PHSZ unter *in vivo* Bedingungen zu.

IV.1.3 *In vivo* Nachweis hämatopoetischer Stammzellen im Mausmodell

Mittlerweile ist man in der Lage durch Transplantation humaner PHSZ in immundefizienten Mäusen eine humane Multilini-Hämatopoese zu generieren. Für diese Ansätze werden unterschiedliche immundefiziente Mausinzuchtstämme verwendet (Tabelle 6).

Tabelle 6: Beispiele immundefizienter Mäuse als Hämatopoese-Modelle

Mausstamm	Genetischer Hintergrund	defizient in
bnx	beige/nude/xid	NK-Zellen (<i>beige</i>), Defekt des Thymus-Epitheliums (<i>nude</i>), B-Zellen und LAK-Zellen (<i>xid</i>)
SCID	C.B-17 scid-/-	T- und B-Zellen infolge eines hereditären DNA-Rekombinasedefektes
NOD/SCID	non-obese diabetic/LtSz-scid	T-, B- und NK-Zellen, Monozytenfunktion (<i>partiell</i>), Komplement-Funktion

Die intravenöse Gabe von humanen mononukleären Zellen aus KM, CB oder peripheren Blut-Stammzell-Präparaten in, durch subletale Ganzkörperbestrahlung konditionierte, immundefiziente Mäuse ist mit der Situation der klinischen Stammzelltransplantation vergleichbar (Kamel, 1988; Vormoor, 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde als Tiermodell für die humane Hämatopoese die NOD/SCID Maus verwendet, da diese zu hohen Raten humaner Hämatopoese führen, was im weiteren als Engraftment bezeichnet wird.

IV.1.4 Die NOD/SCID Maus

Der genetische Hintergrund der SCID Maus ist die C.B-17 Maus, welche durch Kreuzung der BALB/c Maus mit der C57BL/Ka Maus entstanden ist. SCID Mäuse tragen zusätzlich eine homozygote Mutation für das *Prkdc* Gen (Bosma, 1991). Dabei handelt es sich um die katalytische Untereinheit einer DNA-abhängigen

Protein Kinase, der "protein kinase, DNA activated catalytic polypeptide". Im *Prkdc^{scid}* Gen befindet sich eine Nonsense Mutation, welche ein Terminationscodon in das Gen einfügt (Fulop, 1990). Mäuse, die eine homozygote Mutation für das *Prkdc* Gen tragen, haben weder eine humorale noch eine zelluläre Immunität, weil ihnen reife B -und T-Lymphozyten fehlen. Des weiteren fehlt diesen Mäusen die Möglichkeit der Umlagerung von Antigen-Rezeptoren und damit eine adaptive Immunität. Ursache dafür ist die fehlende Aktivierung einer DNA Rekombinase, welche eine funktionsfähige *Prkdc* erfordert. Trotz dieser Defekte kommt es durch zufällige Umlagerungen zur Bildung von B -und T-Zell Antigen-Rezeptoren und zum Phänomen der "leakiness". Bis zu einem Alter von 200 Tagen lassen sich bei 90% der SCID Mäuse im Serum Immunglobuline und T-Zell-Rezeptor positive Lymphozyten nachweisen (Greiner, 1998).

Die NOD Maus ist ein Tiermodell der spontanen Autoimmun T-Zell vermittelten Insulin-abhängigen Diabetes mellitus (IDDM). Diese Mäuse haben diverse Defekte der angeborenen Immunität: Sie sind defizient in der NK-Zell-Aktivität, der Entwicklung der myeloischen Zellreihe und können auf Grund eines C5 Mangels weder den klassischen noch den alternativen Weg der hämolytischen Komplementaktivierung beschreiten (Yamada, 1982). Durch Kreuzung der SCID mit der NOD Maus, entstand die NOD/SCID Maus, welche durch das SCID bedingte Fehlen von T-Zellen keinen autoimmun IDDM entwickelt. Sie zeigt ein 5-10x höheres Engraftment humaner PHSZ verglichen mit der SCID Maus (van der Loo, 1998; Cashman, 1997a; Pflumio, 1996). Ein Grund dafür könnte sein, daß nur 10% der Mäuse bis zu einem Alter von 200 Tagen "leaky" werden, daß heißt, zufällig arrangierte Immunglobuline bilden, und das die Anzahl der murinen Zellen im Knochenmark reduziert ist, wodurch es vermehrt zu Nischen für humane Stammzellen kommt (Shultz, 1995).

Sie ist dadurch für Untersuchungen zum Homing- und Engraftmentpotential humaner PHSZ, bzw. zu deren Charakterisierung sehr gut geeignet. So wurde an NOD/SCID-Mäusen gezeigt, daß bereits ca. 5000 hoch angereicherte $CD34^+CD38^{low}$ Zellen aus humanem Nabelschnurblut ausreichen, um das Knochenmark der Empfängertiere langfristig zu besiedeln und große Mengen hämatopoetischer Tochterzellen zu generieren (Larochelle, 1996). Diese, für das Engraftment in der NOD/SCID-Maus verantwortliche Zelle wird auch als

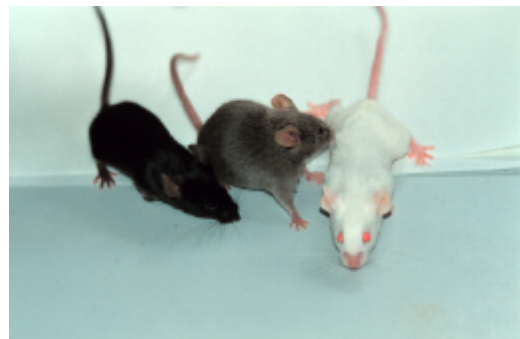


Abbildung 4: Immundefiziente Mäuse.
NOD/SCID Maus (weiß), BDF-1 Maus (schwarz) und DBA-2 Maus (grau)

SCID-repopulierende Zelle (SRC) bezeichnet. Hierbei handelt es sich um eine sehr frühe, vermutlich $CD34^+38^-$ Zelle, die unreifer ist und nicht identisch mit LTC-IC oder CFU. Ihr Anteil im Nabelschnurblut liegt bei 1 von 1×10^6 mononukleärer Zellen im adulten Knochenmark bei 1 von 3×10^6 KM-MNC und in Präparaten mobilisierter peripherer Blutprogenitorzellen bei etwa 1 von 7×10^6 PB-MNC (Wang, 1997).

IV.1.4.1 Ablauf der Chimären-Hämatopoese in der NOD/SCID Maus

Nach intravenöser Verabreichung besiedeln humane Zellen das Knochenmark der Maus. Bereits 2 Tage später befinden sich 0,1-1% der transplantierten $CD34^+$ Zellen im murinen Knochenmark (Cashman, 1997a). Auf eine Latenzzeit von einigen Wochen folgend, beginnt die Produktion von exponentiell ansteigenden Zahlen myeloider und B-lymphoider Vorläuferzellen (Goan, 1995). Fünf bis 8 Wochen nach Transplantation kann in Abhängigkeit von der Dosis transplantierte SRC der Anteil der humanen Zellen im murinen Knochenmark 10% bis 80% betragen. Reifere myeloide und B-lymphoide Zellen werden in die peripheren Organe (Blut >Thymus >>Milz >Leber >Lunge) abgegeben und sind hier im Maximum nach 8 bis 10 Wochen nach Transplantation zu finden. Humane Thymozyten und NK-Zellen werden nicht generiert. Während dieses Zeitraumes sind im Chimären-Knochenmark auch geringe Mengen früher humaner $CD34^+$ Zellen nachweisbar (Cashman, 1997b; Goan, 1995). Ab der 10. bis 12. Woche nach Transplantation $CD34^+$ peripherer Blutstammzellen sind diese im murinen Knochenmark nur noch vereinzelt vorhandenen humanen Vorläuferzellen nicht mehr proliferationsaktiv, während $CD34^+$ Zellen aus Nabelschnurblut im murinen Knochenmark anhaltend proliferieren und praktisch lebenslänglich (d.h. über etwa 10 Monate in NOD/SCID-Mäusen) humane hämatopoetische Zellen generieren können (Wang, 1997).

Anders als Transplantate aus Nabelschnurblut, bedürfen frühe Vorläuferzellen aus Knochenmark oder peripherem Blut dabei der kontinuierlichen Supplementierung mit humanen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, wie hIL-3, hGM-CSF oder hSCF (Lapidot, 1992; Nolta, 1994; Goan, 1996). Exogen appliziertes humanes Erythropoietin (EPO) unterstützt die Bildung humaner erythroider Vorläuferzellen (Cashman, 1997b).

Um größere Mengen von PHSZ zu generieren, werden zur Zeit zahlreiche, teilweise sehr aufwendige Protokolle zur Expansion dieser Zellen erarbeitet (David, 1997; Piacibello, 1999; Ruggieri, 1994). Dabei besteht die Schwierigkeit, das sogenannte "self-renewal" der Zellen zu fördern und die Differenzierung zu unterdrücken. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, daß *ex vivo* in Flüssigkultur expandierte und/oder genmanipulierte humane $CD34^+$ Zellen ihr langzeit-repopulierendes Potential in Abhängigkeit von den verwendeten Wachstumsfaktoren und der Kulturdauer meist schon innerhalb von 2-10 Tagen ganz oder teilweise verlieren (Larochelle, 1996).

V. Aufgabenstellung

Die bisher beschriebenen Experimente zum Einfluß von HHV-6 auf die Hämatopoese wurden entweder aus in der Anzahl begrenzten, klinischen Beobachtungen abgeleitet oder in stark vereinfachenden *in vitro* Systemen durchgeführt, die der Komplexität der humanen Hämatopoese jedoch nicht gerecht werden.

Deshalb war es Ziel dieser Arbeit, am *in vivo* Modell der NOD/SCID Maus den Einfluß von HHV-6 auf die humane Hämatopoese zu untersuchen.

Zuerst mußten sensitive, verlässliche Nachweismethoden für HHV-6 etabliert werden. Darüber hinaus sollten diese Methoden den Nachweis einer aktiven Virusvermehrung ermöglichen, durch Quantifizierung von DNA oder den Nachweis von HHV-6 RNA oder HHV-6 Antigenen. Diese Methoden sollten für klinische Fragestellungen anwendbar sein.

Obwohl Herpesviren streng spezies-spezifisch sind, galt es vor Etablierung des Mausmodells zu klären, ob es zu einer latenten oder aktiven Infektion von Maus Zellen in der NOD/SCID Maus kommt oder HHV-6 sogar pathogen für die NOD/SCID Maus sein könnte, wodurch die Anwendbarkeit dieses Modells eingeschränkt wäre.

Um auch geringere Einflüsse des Virus zu erfassen, sollte das Modell der NOD/SCID Maus optimiert werden. Dazu wurden verschiedene Transplantations-Bedingungen variiert, wie zum Beispiel der Reinheitsgrad der Zellen und die Transplantatdosis sowie die zusätzliche Gabe von humanen Cytokinen. Mit Hilfe verschiedener Infektionsprotokolle sollte dann untersucht werden, ob die HHV-6-Infektion menschlicher hämatopoetischer Zellen:

1. Das Engraftmentpotential langzeit-repopulierender Stammzellen verändert?
2. Ihre linienspezifische Differenzierung beeinträchtigt?
3. Die Stromazell-Bildung beeinflusst wird?
4. Die HHV-6 Varianten A und B zu unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich der genannten Parameter führen

Abbildung 5 faßt den Versuchsaufbau für die Untersuchungen am NOD/SCID Maus Modell schematisch zusammen.

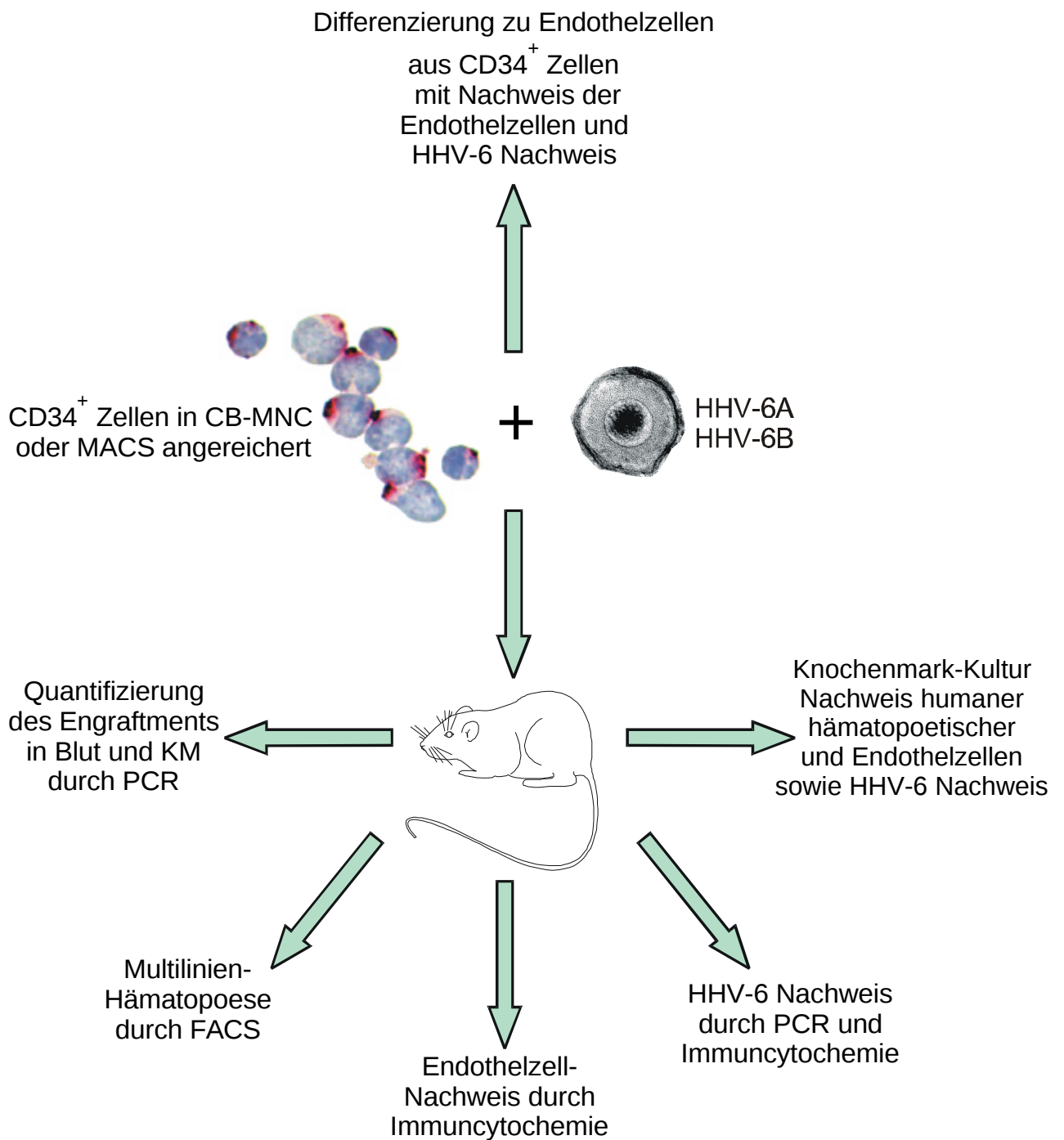


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Versuches zur Untersuchung des Einflusses von HHV-6 auf die Chimären-Hämatopoese in der NOD/SCID Maus.