

## C. Ergebnisse und Auswertung

### I. Etablierung sensitiver HHV-6 Nachweisverfahren

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Reihe von Verfahren zum Nachweis von HHV-6 entwickelt. Diese umfaßten den immunocytochemischen Nachweis HHV-6 spezifischer Proteine durch den Einsatz monoklonaler Antikörper oder den Nachweis HHV-6 spezifischer Nukleinsäuren mit der PCR.

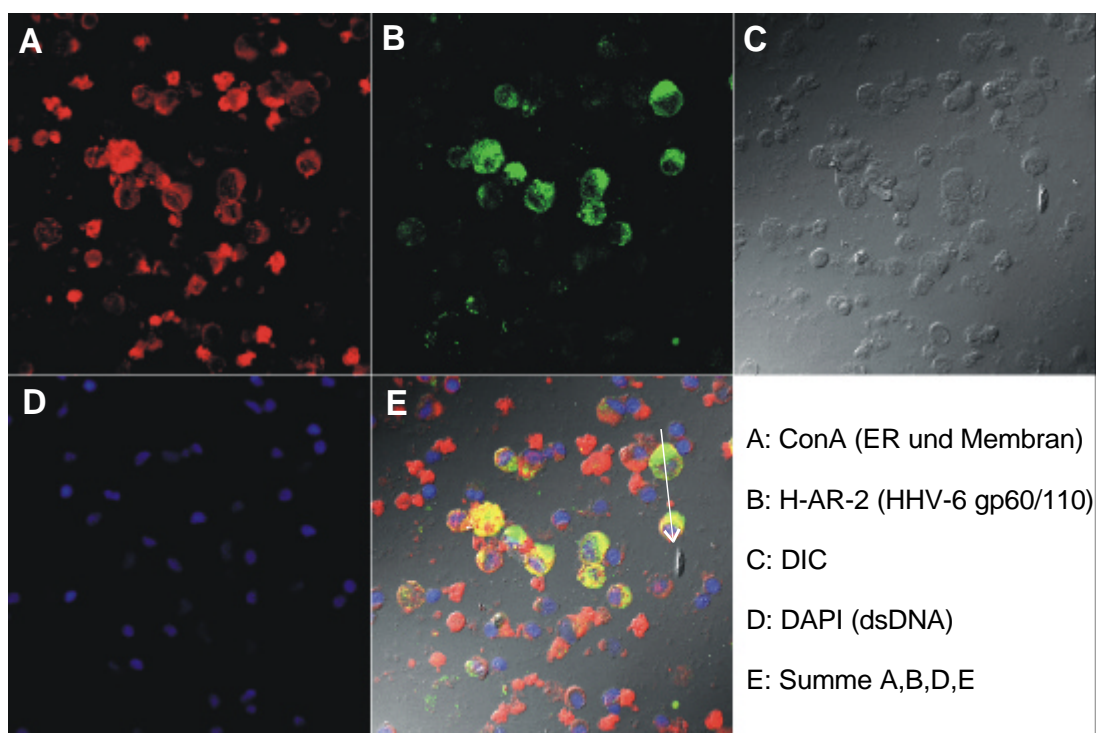
#### I.1 Nachweis von HHV-6 Proteinen

Im Verlauf dieser Arbeit konnten 10 verschiedene HHV-6 spezifische mAb getestet werden (siehe Tab 10). Als Untersuchungsmaterial zur Etablierung dienten mit dem HHV-6A Stamm U1102 *in vitro* infizierte HSB-2 Zellen und mit dem HHV-6B Stamm R104 *in vitro* infizierte CB-MNC.

##### I.1.1 IFA

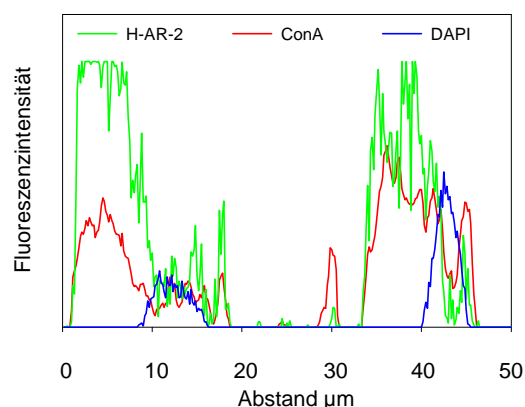
Präparate infizierter und nicht infizierter Zellen wurden wie unter B.I.5.1.1 beschrieben mit den in Tabelle 10 genannten mAb gefärbt und mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (cLSM) hinsichtlich Spezifität der Signale, deren Intensität und erkennbarer Lokalisation ausgewertet. Die Färbekontrolle wurde völlig analog durchgeführt, jedoch ohne Inkubation mit dem HHV-6 spezifischen Primär-Antikörper. Zusätzlich zu den Fluoreszenzaufnahmen wurden die gefärbten Zellen im Digitalen Interferenzkontrast (DIC) aufgenommen, wodurch die dreidimensionale Struktur der Zellen sichtbar gemacht werden kann. Als Gegenfärbung wurden ConcanavalinA (ConA) und DAPI verwendet. ConA, ein Lektin, bindet an Oligosaccharide und markiert dementsprechend die Zellmembran und das Endoplasmatische Reticulum (ER). DAPI bindet bevorzugt an die kleine Furche doppelsträngiger DNA und markiert deshalb den Zellkern. Mit Hilfe dieser Gegenfärbungen und der DIC Aufnahme kann also zusätzlich ein Eindruck von der Morphologie der Zelle erhalten und die Lokalisation des HHV-6 spezifischen Signals bestimmt werden. Die cLSM Software erlaubt weiterhin die Erstellung eines Farbprofils, bei dem über eine beliebig gewählte Strecke (hier angezeigt durch einen weißen Pfeil) die Intensität der aufgenommenen Farben über der Strecke aufgetragen wird. Dadurch lassen sich Ko-Lokalisationen von Fluoreszenzsignalen sehr leicht anschaulich machen.

Abbildung 7 zeigt exemplarisch die einzelnen Fluoreszenzsignale für ConA (Abb. 7A, rot), HHV-6 mAb H-AR-2 (Abb. 7B, grün), DAPI (Abb. 7D, blau) und das DIC Bild (Abb. 7C) HHV-6B infizierter CB-MNC. Abb. 7E stellt die Summe der 4



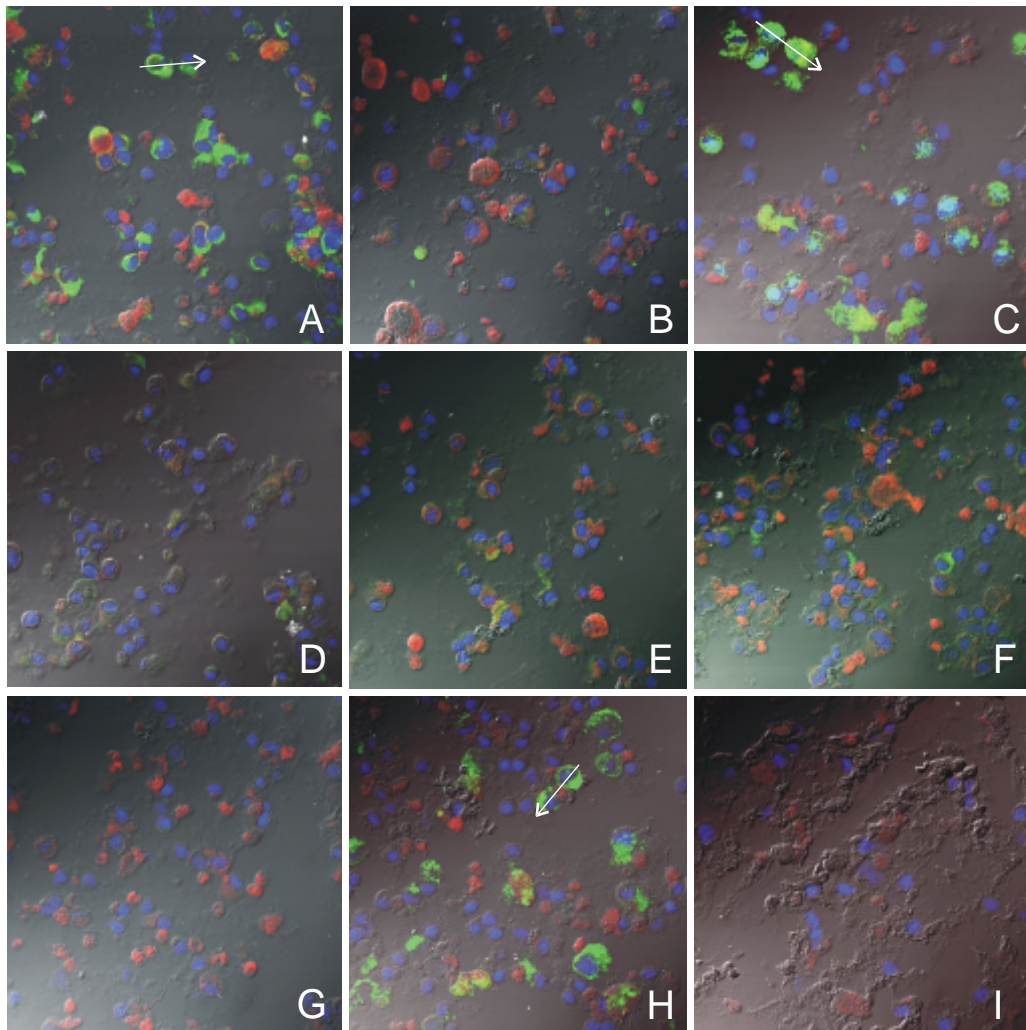
**Abbildung 7:** cLSM Aufnahme HHV-6B infizierter CB-MNC nach 6 Tagen nach IFA mit mAb H-AR-2 (500x). Der weiße Pfeil markiert Richtung und Länge des Farbprofils von Abb. 8.

Einzelbilder dar. Es ist deutlich zu sehen, daß ConA fast alle Zellen, jedoch mit unterschiedlicher Intensität, färbt. Die Signale mit mAb H-AR-2, welcher identisch ist mit gp60/110, sind sehr intensiv und deutlich im Zytoplasma infizierter Zellen lokalisiert. Da 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 also späte Ereignisse im Infektionszyklus an. Dabei fällt auf, daß die Antigen positiven Zellen oft deutlich größer sind als nicht infizierte, d.h. sie weisen den typischen CPE auf. Dieser CPE konnte auch im DIC Bild bestätigt werden, die Antigen positiven Zellen sind deutlich vergrößert und wirken aufgeblasen, verglichen mit Antigen negativen Zellen. Erstellt man das Profil der



**Abbildung 8:** Profil der Fluoreszenzintensitäten nach IFA mit mAb H-AR-2. Richtung des Farbprofils ist in Abb. 7E gezeigt.

Farbintensitäten (Abb. 8), so wird die cytoplasmatische Lokalisation der H-AR-2 Signale bestätigt. Dort wo das ConA Signal am intensivsten erscheint, ist auch das H-AR-2 Signal lokalisiert. Der DAPI gefärbte Kern zeigt kein zusätzliches H-AR-2 Signal. Nicht infizierte CB-MNC und die Färbekontrolle zeigten keine Signale mit H-AR-2, der Antikörper bindet also spezifisch.



**Abbildung 9: cLSM Aufnahmen HHV-6B infizierter CB-MNC nach 6 Tagen und IFA mit 8 verschiedenen mAb (500x).** Die weißen Pfeile markieren Richtung und Länge der Farbprofile von Abb. 10. Abb.9A: H-AR-6, 9B: H-AR-9, 9C: H-IG-20, 9D: H-Pol-10, 9E: H-WL-5, 9F: H-WL-8, 9G: p41, 9H: gp106, 9I: Negativkontrolle nach Färbung ohne HHV-6 spezifischen mAb gezeigt.

Für alle weiteren getesteten mAb ist in Abb. 9 nur das Summenbild entsprechend Abb. 7E gezeigt. Mit mAb H-AR-6 (Abb. 9A) konnten ebenfalls sehr intensive Signale erhalten werden. Nach Angaben des Herstellers soll dieser mAb wie H-AR-2 gp60/110 binden, jedoch auch das homologe Protein in dem HHV-6 verwandten Virus HHV-7 erkennen. Diese Kreuzreaktion konnte an Cytopräparaten HHV-7 infizierter Sup-T1 Zellen bestätigt werden (zur Verfügung gestellt von Ian Mackay, Sir Albert Sakzewski Virology Research Center, Brisbane, Australien). Die Lokalisation des H-AR-6 Signals erwies sich im Profil der Farbintensitäten ebenfalls als zytoplasmatisch (Abb. 10A) und war in der Mehrheit auf Zellen mit CPE beschränkt. Zusätzlich zur Kreuzreaktion mit HHV-7 zeigte der mAb H-AR-6 schwache Signale mit nicht infizierten HSB-2 Zellen.

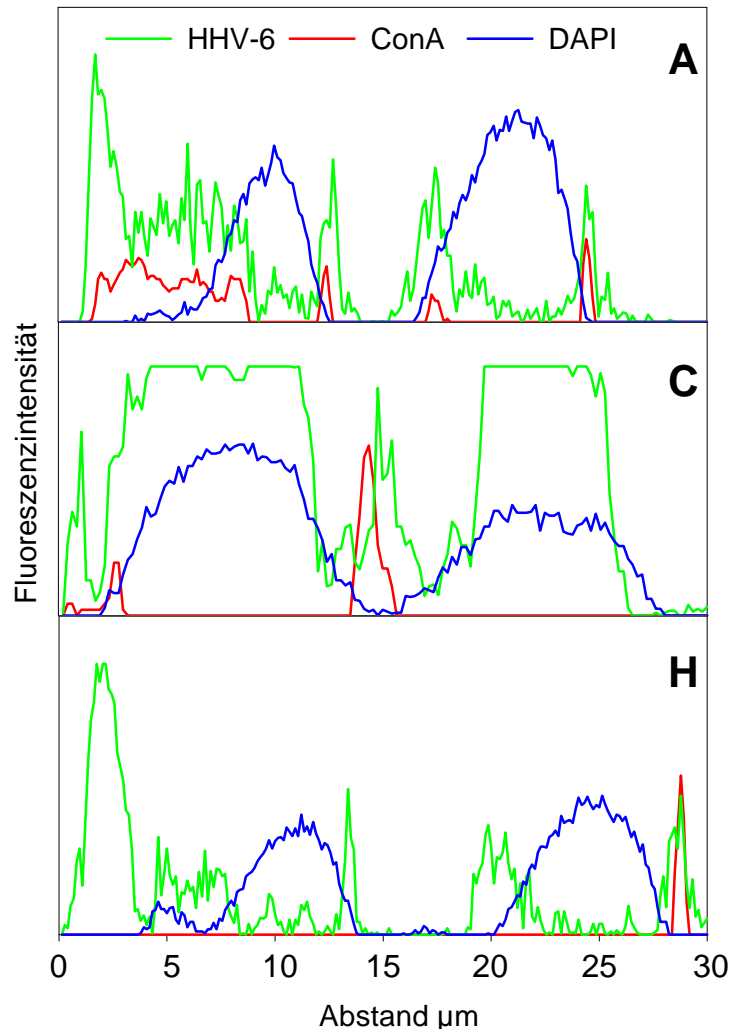
Signale mit H-AR-9 waren nur vereinzelt in kleinen, pyknotischen Zellen ohne typischen CPE zu beobachten (Abb. 9B). H-AR-9 ist gegen gp200, ein Glykoprotein

in der Virushülle gerichtet, welches offensichtlich schwach exprimiert wird oder erst nach fortgeschrittener Zerstörung der Zelle zu finden ist.

Intensive Signale in Zellen mit CPE wurden mit dem mAb H-IG-20 (Abb. 9C) beobachtet. Dieser bindet ein Protein des Viruskapsids, p140 VCA, welches im Kern infizierter Zellen zusammengesetzt wird. Wie mit Hilfe des Profils der Farbintensitäten (Abb. 10C) deutlich wird, sind Signale mit diesem mAb deshalb sowohl im Zytoplasma, als auch im Kern infizierter Zellen zu finden.

Die mit mAb H-Pol-10 und H-WL-5 erhaltenen Signale waren vergleichsweise schwach (Abb. 9D, E). Da H-Pol-10 an die virale DNA Polymerase und H-WL-5 an ein immediate early Antigen von HHV-6 binden soll, wird deren Signal im Kern erwartet, was nicht bestätigt werden konnte. Auch nach Fixierung mit Formaldehyd oder Aceton/Methanol Gemischen wurden keine intensiveren Signale erhalten. H-WL-8, gerichtet

gegen ein spätes cytoplasmatisches Antigen, zeigte kaum intensive Signale im Zytoplasma weniger Zellen (Abb. 9F). Diese Zellen wiesen jedoch keinen CPE auf, was bei einem spätem cytoplasmatischen Antigen aber zu erwarten gewesen wäre. Mit mAb p41 (Abb. 9G) waren keine Signale erkennbar. Bei Erhöhung der mAb Konzentration auf 40 µg/mL wurden Signale sichtbar, die jedoch unspezifisch auch in nicht infizierten Zellen auftraten. Dagegen zeigte mAb gp106 sehr intensive, spezifische Signale cytoplasmatischer Lokalisation (Abb. 9H). Da dieser mAb wie H-AR-2 ebenfalls an ein Glykoprotein (gp106) in der Virushülle bindet, wird das



**Abbildung 10:** Profile der Fluoreszenzintensitäten der mAb H-AR-6 (A), H-IG-20 (C) und gp106 (H). Die Benennung bezieht sich auf Abb. 9.

Signal im Zytoplasma erwartet, was durch das Profil der Farbintensitäten bestätigt werden konnte (Abb. 10H).

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden die mAb H-AR-2, H-IG-20 und gp106 für alle weiteren Untersuchungen verwendet. Tabelle 26 faßt die Ergebnisse bei optimierter Verdünnung der HHV-6 spezifischen mAb zusammen.

**Tabelle 26: Charakteristika der HHV-6 mAb**

Antikörper	HHV-6 Spezifität	Intensität	Lokalisation
H-AR-2*	+	+++	<i>Cytoplasmatisch, häufig mit CPE</i>
H-AR-6	-, Kreuzreaktion mit HHV-7	++	<i>Cytoplasmatisch, häufig mit CPE</i>
H-AR-9	+	++	<i>diffus, die ganze Zelle ist gefärbt, ohne CPE</i>
H-IG-20	+	+++	<i>Cytoplasmatisch und nukleär, häufig mit CPE</i>
H-Pol-10	+	+	<i>Cytoplasmatisch ?</i>
H-WL-5	+	+	<i>Cytoplasmatisch ?</i>
H-WL-8	+	++	<i>Cytoplasmatisch ?</i>
gp106	+	+++	<i>Cytoplasmatisch, häufig mit CPE</i>
p41	-	-	<i>keine</i>

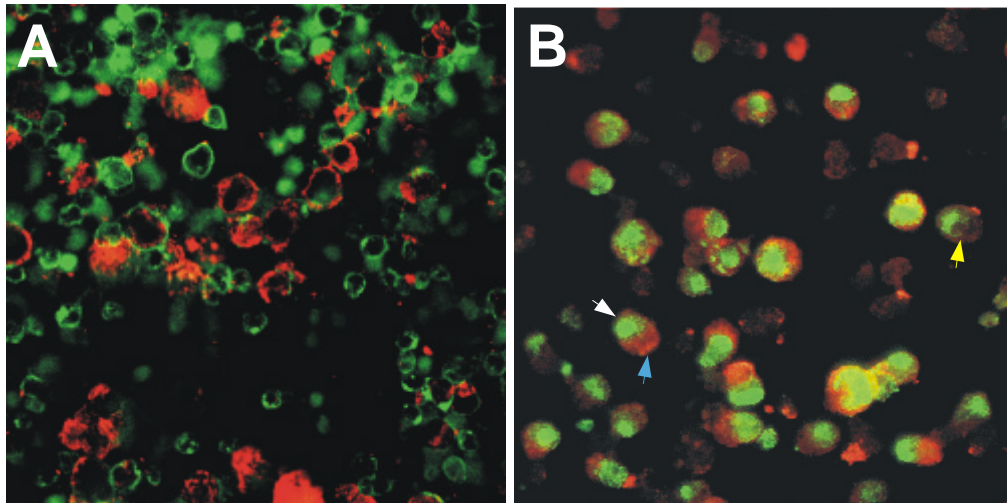
\* H-AR-2 ist identisch mit gp60/110

### I.1.2 IFA-Doppelfärbung

Zur näheren Charakterisierung HHV-6 infizierter Zellen, wurde eine Methode zur gleichzeitigen Färbung von zellspezifischen Markern und HHV-6 Antigenen etabliert. Da die hier verwendeten HHV-6 spezifischen Antikörper alle in der Maus generiert wurden und die Antikörper zum Nachweis bestimmter Zelltypen ebenfalls normalerweise Antikörper aus der Maus sind, können diese nicht nebeneinander ohne ungewünschte Kreuzreaktion mit Maus-spezifischen Sekundär-Antikörpern detektiert werden. Um dieses Problem zu umgehen, wurde der HHV-6-spezifische mAb H-AR-2 biotinyliert (H-AR-2bio). Er kann so mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Streptavidin nachgewiesen werden.

Abbildung 11A zeigt die Doppelfärbung von HHV-6B infizierten CB-MNC mit den Antikörpern H-AR-2bio (rot markiert mit Streptavidin Tetramethyl-Rhodamin) und einem CD45 spezifischen mAb (grün markiert mit Maus spezifischem mAb Alexa 488). Wie erwartet tragen nahezu alle Zellen das grüne Signal für CD45, während Zellen mit CPE zusätzlich ein rotes Signal für HHV-6 zeigen. Ist der CPE sehr ausgeprägt, fehlt das Signal für CD45, vermutlich wegen bereits starker Zerstörung der Zellmembran. Neben den hier gezeigten CD45 positiven Zellen konnten auf diese Weise auch CD33, CD4 und CD71 positive Zellen als HHV-6 infiziert

nachgewiesen werden. Dabei wurde kein Unterschied zwischen den HHV-6 Varianten A und B festgestellt.



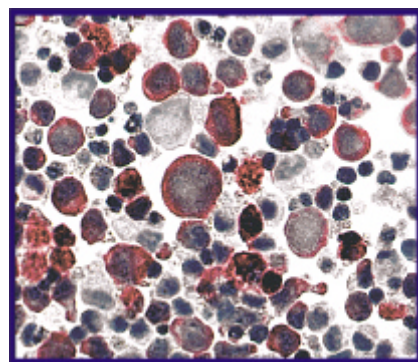
**Abbildung 11: IFA Doppelfärbungen HHV-6B infizierter CB-MNC.**

A: CD45 (grün)/H-AR-2bio (rot); B: H-IG-20 (grün)/H-AR-2bio (rot) (500x)

Abb. 11B zeigt die Doppelfärbung von HHV-6 infizierten CB-MNC mit zwei HHV-6 spezifischen Antikörpern: H-AR-2bio (rot markiert mit Streptavidin Tetramethyl-Rhodamin) und H-IG-20 (grün markiert mit  $\alpha$ -Maus Alexa 488). Tatsächlich kann in dieser Doppelfärbung die unterschiedliche Lokalisation der beiden HHV-6 Antigene, gp60/110 und p140 VCA, dargestellt werden. Wie schon in Einzelfärbungen gezeigt, ist das H-AR-2 Signal im Zytoplasma lokalisiert (roter Pfeil), während das H-IG-20 Signal in vielen Zellen im Kern lokalisiert ist (weißer Pfeil). Einige Zellen zeigen ausschließlich das grüne Signal von mAb H-IG-20 im Kern (gelber Pfeil). Diese Zellen befinden sich in einem frühen Stadium der Infektion.

### I.1.3 APAAP

Als lichtmikroskopischer Nachweis wurde die APAAP Methode verwendet, wie unter I.5.1.2 beschrieben. Durch die APAAP Reaktion soll es zu einer Signalverstärkung kommen, die jedoch mit einem höheren Aufwand bei der Färbung verbunden ist. Zum Vergleich wurden infizierte und nicht infizierte Zellen mit dem IFA und der APAAP parallel unter Verwendung des mAb H-AR-2 gefärbt. Die Ergebnisse wurden hinsichtlich des Anteils positiver Zellen und der Spezifität verglichen. Dabei wurden ~400 Zellen ausgezählt. Der Anteil positiver Zellen war in APAAP gefärbten Präparaten mit ~25% höher als



**Abbildung 12: APAAP Färbung HHV-6A infizierter HSB-2 Zellen mit mAb H-AR-2 (1000x)**

bei IFA Färbungen mit ~15%. Die APAAP positiven Zellen waren dabei deutlich rot erkennbar (Abb. 12). Die Anfärbung war in vielen Fällen im Zytoplasma zu erkennen, durch die starke Färbung war eine genauere Lokalisation und die Morphologie der positiven Zelle jedoch oft schwer zu erkennen. In der Regel blieben die uninfizierten Kontrollzellen bei der APAAP negativ. In manchen Fällen zeigte sich jedoch eine diffuse, unspezifische rosa Anfärbung aller Zellen, auch der Kontrollzellen, was eine eindeutige Identifizierung der schwach positiven Zellen erschwerte.

#### I.1.4 TYR-Signalverstärkung

Bei der TYR-Signalverstärkung soll eine weitere Absenkung der Nachweisgrenze durch eine ~1000-fache Signalverstärkung erreicht werden. Der Aufwand bei der Färbung entspricht bei dieser Methode dem der APAAP Färbung. Infizierte und nichtinfizierte Zellen wurden mit mAb H-AR-2 gefärbt wie unter I.5.1.3 beschrieben. Bezüglich der Nachweisgrenze konnten mit dieser Methode keine Vorteile gegenüber der APAAP festgestellt werden. Beide Methoden detektierten in einem Vergleich 25%

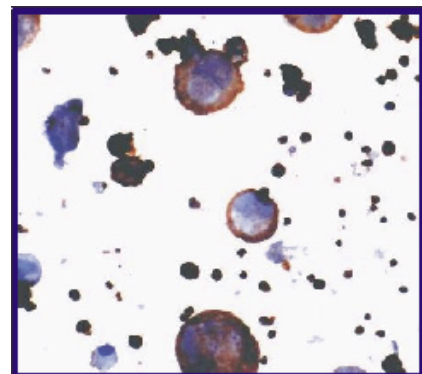


Abbildung 13: Tyramid Färbung HHV-6A infizierter HSB-2 Zellen mit mAb H-AR-2 (1000x)

HHV-6 positive Zellen. HHV-6 positive Zellen erschienen im Lichtmikroskop braun, wie in Abb. 13 gezeigt. Durch die intensive braune Färbung positiver Zellen war die Morphologie der infizierten Zellen nur noch schwer erkennbar.

#### I.1.5 APAAP-TYR Doppelfärbung

Auch mit den lichtmikroskopischen Färbetechniken APAAP und TYR-Signalverstärkung wurde versucht, eine Doppelfärbung zu etablieren. Zuerst wurde die TYR-Färbung durchgeführt, da dabei der Primär-Antikörper durch die Ablagerung des Tyramids eingeschlossen und somit für die zweite Färbung, die APAAP, unzugänglich gemacht wird. Da beide Färbungen unmittelbar hintereinander gemacht werden müssen, ist der zeitliche Aufwand sehr hoch. Abb. 14 zeigen das Ergebnis einer solchen Doppelfärbung. Infizierte HSB-2 Zellen wurden dabei zuerst mit dem HHV-6 spezifischen mAb H-AR-2

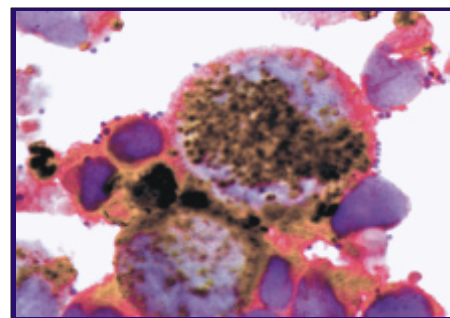


Abbildung 14: Doppelfärbung mit APAAP und TYR Färbung. APAAP: CD7, rot und TYR H-AR-2, braun (2000x)

mittels der TYR-Signalverstärkung gefärbt (braune Färbung). Direkt im Anschluß wurde mit einem mAb gegen den stark exprimierten Marker CD7 mittels der APAAP gefärbt (rote Färbung).

Tabelle 27 faßt die Charakteristika der immuncytochemischen Nachweismethoden vergleichend zusammen.

**Tabelle 27: Vergleich immuncytochemischer Nachweismethoden für HHV-6**

Methoden	Sensitivität	Spezifität	Dauer	Bemerkungen
IFA	+	+	1,5 h	<i>Fluoreszenzmikroskop erforderlich, gut geeignet für Doppelfärbungen</i>
APAAP	++	+/-	6,0 h	<i>Morphologie der Zellen gut erkennbar</i>
TYR-Signalverstärkung	++	+	6,0 h	<i>Morphologie der Zellen gut erkennbar, teuer</i>

### I.1.6 Antikörper Blockierung

Zum Nachweis der Spezifität des mAb H-AR-2 wurde dieser wie unter I.5.1.4 beschrieben mit Protein-Rohextrakten infizierter Zellen inkubiert, um seine spezifischen Bindungsstellen für HHV-6 Antigen gp60/110 zu blockieren. Mit diesen unterschiedlich stark "blockierten" mAb wurde dann erneut eine Färbung infizierter Zellen durchgeführt und der Anteil HHV-6 positiver Zellen bestimmt. Das gereinigte Antigen gp60/110 stand in dieser Arbeit nicht zur Verfügung, weshalb Protein-Rohextrakte U1102 infizierter HSB-2 Zellen verwendet wurden.

Zur Blockierung wurden unterschiedliche Verhältnisse von Protein-Rohextrakt (Antigen) zu Antikörper (AG/mAb) eingesetzt, um mit Sicherheit sämtliche Bindungsstellen des mAb blockieren zu können. So konnte gezeigt werden, daß mit steigendem Verhältnis von AG/Ab bei

**Tabelle 28: Antigen positive Zellen nach Blockierung mit:**

mAb/AG	U1102-HSB-2	HSB-2
3/1	40%	40%
1/1	20%	40%
1/3	0%	40%

der Sättigung, die Bindungsfähigkeit der mAb an infizierte Zellen entsprechend abnahm. Während nach Blockierung mit einem Verhältnis AG/Ab von 1:3 in 40% der Zellen HHV-6 Antigen nachweisbar war, zeigte sich bei einem Verhältnis AG/Ab von 1:1 eine partielle Blockierung; nur 20% der gleichen infizierten Zellen waren im IFA positiv. Wurde das Antigen im Überschuß von 3:1 zur Blockierung eingesetzt, konnte keine Bindung der blockierten Antikörper an infizierte Zellen beobachtet werden. Analog durchgeführte Versuche mit Protein-Rohextrakten nicht infizierter HSB-2 Zellen zeigten keine Reduzierung der Bindungseigenschaften des mAb H-AR-2 (Tab 28). Die Bindung von mAb H-AR-2 kann demnach nur durch



Protein-Rohextrakte infizierter Zellen unterbunden werden. Diese Ergebnisse konnten mit der APAAP verifiziert werden.

## I.2 Nachweis von HHV-6 Nukleinsäuren

Zum Nachweis von HHV-6 Nukleinsäuren wurden drei verschiedene PCR Tests etabliert. Die Etablierung bestand aus Primerauswahl, Erstellung von Positivkontrollen und Optimierung bezüglich der Magnesiumkonzentration, der Primerkonzentration in einer Primermatrix und des Temperaturprofils der PCR Reaktion. Bei der Auswahl der Primer wurden allgemein gültige Richtlinien zugrunde gelegt. Abschließend wurde durch Datenbanksuchen kontrolliert, ob die Primer homolog zu humanen oder anderen viralen, nicht HHV-6 spezifischen Sequenzen sind.

### I.2.1 snPCR

Die Primer für die snPCR wurden so ausgewählt, daß sie zwar an DNA beider HHV-6 Varianten binden, jedoch in einem Bereich, in dem die Genome von HHV-6A und HHV-6B unterschiedlich groß sind. Dadurch entstehen trotz Verwendung identischer Primer unterschiedlich große Amplifikate, sowohl nach der ersten PCR (äußere Primer) als auch nach der zweiten PCR (mittlerer und linker Primer). Abbildung 15 zeigt schematisch die Lokalisation der Primer auf dem HHV-6A und HHV-6B Genom.

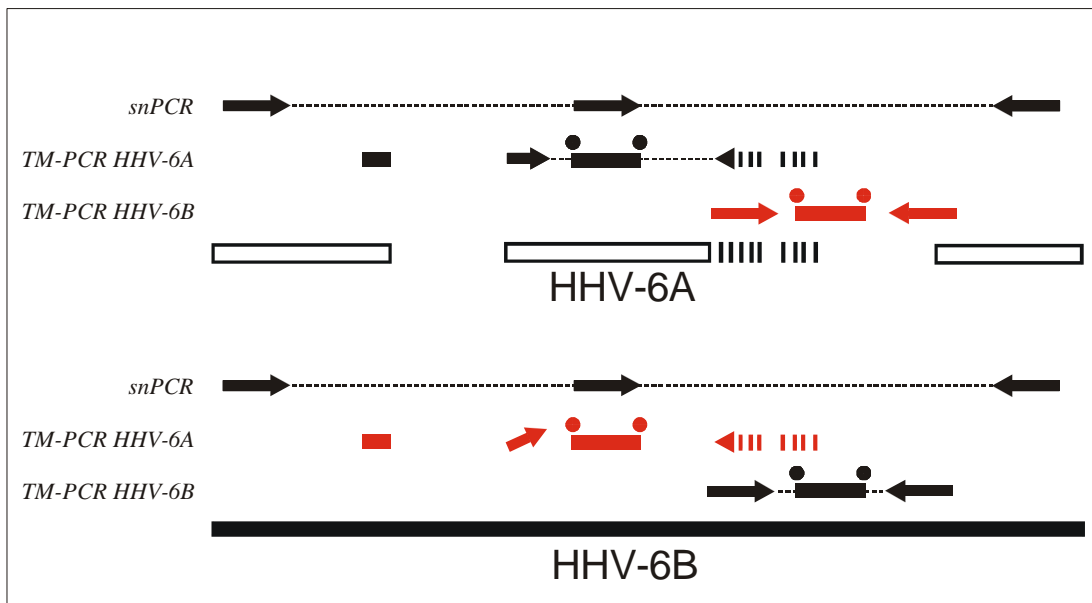


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Lokalisation und Orientierung von Primern (→) und Exonuklease-Sonden (●●) zum Nachweis von HHV-6 DNA.

Zur Etablierung der PCR wurde zuerst DNA aus infizierten Zellen präpariert (siehe B.I.4.1) und als Matrize verwendet. Als Negativkontrolle diente DNA aus nicht

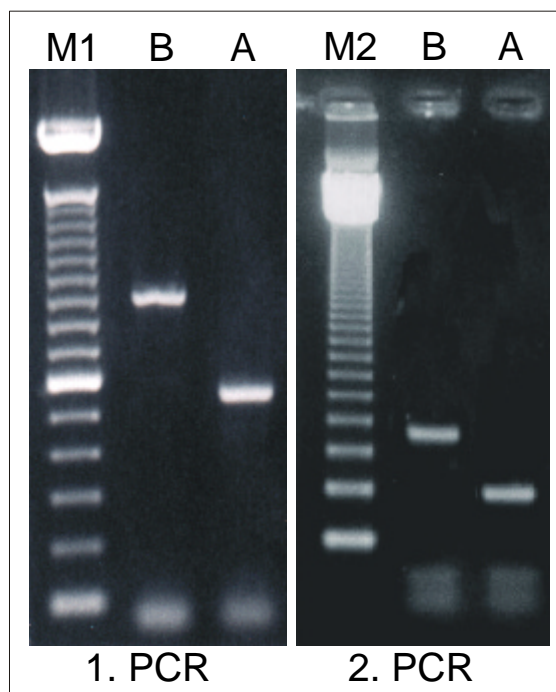
infizierten CB-MNC. Bei Durchführung der PCR unter den optimierten Bedingungen (siehe C.I.2) erhielt man diskrete Banden der erwarteten Größe für HHV-6A und HHV-6B nach der ersten Amplifikation ausschließlich mit DNA aus infizierten Zellen. Die Amplifikate der ersten PCR hatten eine Größe von 563 bp für HHV-6A und 911 bp für HHV-6B. Wurde das Amplifikat erneut als Matrize in die zweite PCR mit einem eingerückten Primer (IE03) eingesetzt, so erhielt man variantenspezifische Amplifikate der Größe 246 bp für HHV-6A und 464 bp für HHV-6B. Abbildung 16 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte, wobei der Größenunterschied der Amplifikate deutlich erkennbar ist.

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze der snPCR wurden Plasmide kloniert, welche die PCR Produkte der ersten PCR enthalten (siehe B.I.5.4) und als pH6ieA und pH6ieB bezeichnet.

Durch Sequenzierung der Plasmide erfolgte die Bestätigung der erwarteten Sequenz für HHV-6A und HHV-6B. Nach Messung der  $OD_{260}$  und Berechnung der Plasmidkonzentration wurden Verdünnungsreihen der Plasmide als Matrize für die snPCR verwendet. Die Nachweisgrenze für die erste Amplifikation liegt bei 100-1,000 Plasmiden pro Reaktion, die Nachweisgrenze für die zweite Amplifikation bei 10-100 Plasmiden pro Reaktion. Diese PCR wird zur Zeit zur diagnostischen Überwachung von Patienten nach Knochenmark-Transplantation im Virchow-Klinikum verwendet.

### I.2.2 TM-PCR

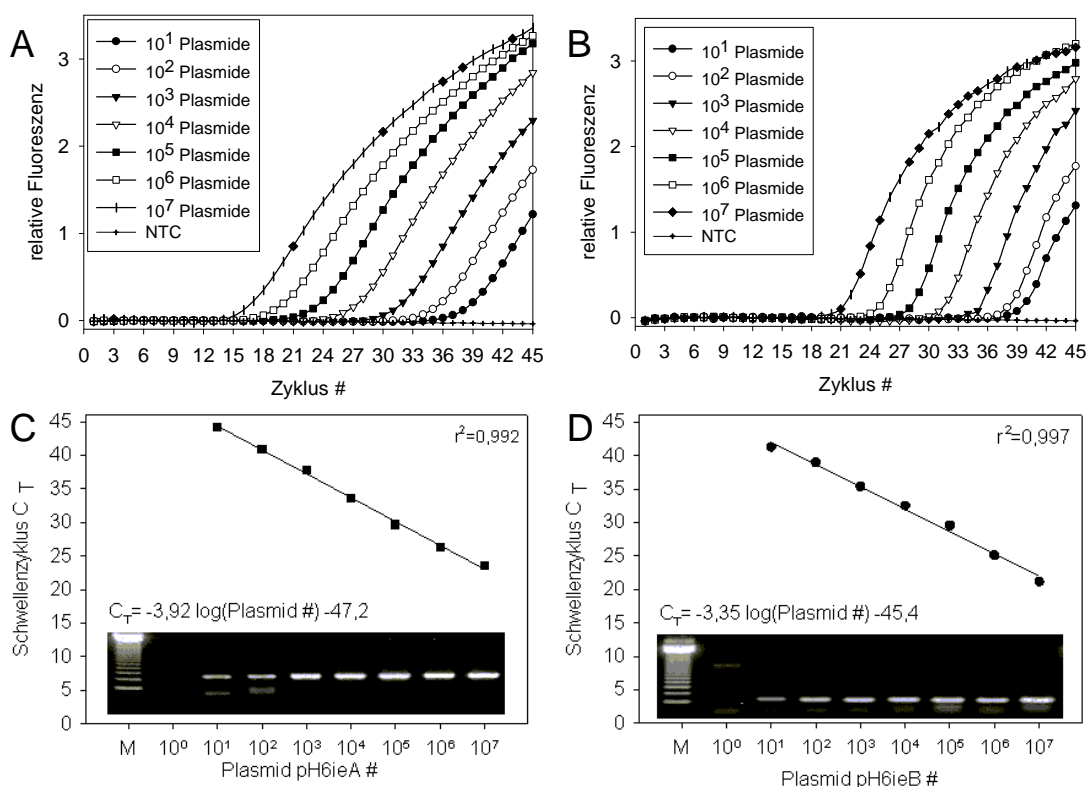
Die Echt-Zeit PCR erlaubt sehr genaue DNA Quantifizierungen mit der PCR (siehe I.5.2.2). Deshalb wurde für jede der HHV-6 Varianten A und B jeweils ein Set aus Primern und Exonuklease-Sonde ausgewählt, welches ausschließlich eine der beiden Varianten amplifiziert. Abb. 15 zeigt für die TM-PCR die Lage und Orientierung der verwendeten Primer und Exonuklease-Sonden. Es wird daraus ersichtlich, daß die Primer zum Nachweis von HHV-6A nur an DNA der A Variante binden können,



**Abbildung 16:** Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR Produkte der snPCR. M1: 100 bp Leiter, M2: 123 bp Leiter, A: HHV-6A DNA, B: HHV-6B DNA (2% Agarose Gel).

während eine Bindung an HHV-6B DNA nicht möglich ist (rote Pfeile). Für den HHV-6B Nachweis stellt sich die Situation umgekehrt dar: Die Primer binden ausschließlich an DNA der Variante B, HHV-6A DNA wird nicht gebunden (rote Pfeile). Die beiden PCR Reaktionen müssen zwar in unterschiedlichen PCR Gefäßen durchgeführt werden, da jedoch die Temperaturbedingungen für beide Tests identisch sind, kann die Quantifizierung beider Varianten A und B parallel während eines PCR Laufes geschehen. Zur Optimierung dieser Tests wurden die gleichen Positiv- und Negativkontrollen verwendet wie für die snPCR.

Die Kalibrierung der Quantifizierung durch die TM-PCR erfolgte mittels Verdünnungsreihen der Plasmide pH6ieA und pH6ieB. Diese wurden in Zehnerschritten von  $10^7$  bis  $10^1$  ge/Tests in Aqua bidest angefertigt und in der TM-PCR in sechsfacher Bestimmung gemessen (Abb. 17).



**Abbildung 17: Amplifikationskurven und Standardgeraden der HHV-6 TM-PCR.** Messung serieller Plasmidverdünnungen von pH6ieA (Abb. 17A) und pH6ieB (Abb. 17B). Der aus den Amplifikationskurven berechnete Schwellenzyklus  $C_T$  wurde verwendet, um Standardgeraden für HHV-6A (Abb. 17C) und HHV-6B (Abb. 17D) zu erstellen. Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR Produkte spiegelt die Verdünnung der Plasmide wider.

Die aus den Amplifikationskurven ermittelten Schwellenzyklen ( $C_T$ ) wurden über dem Logarithmus der Plasmidkonzentration aufgetragen; wie erwartet liegen die Werte auf einer Geraden (Abb. 17C, 17D). Durch lineare Regression läßt sich die Gleichung der Standardgerade ermitteln; nach Umformen erhält man den direkten Bezug zwischen enthaltener Menge an Zielsequenz (Genomäquivalenten, ge) und gemessenem Schwellenzyklus (Formel 1).

$$ge_{HHV-6A} = 10^{\frac{45,00 - C_T}{3,41}} \quad ge_{HHV-6B} = 10^{\frac{45,50 - C_T}{3,37}}$$

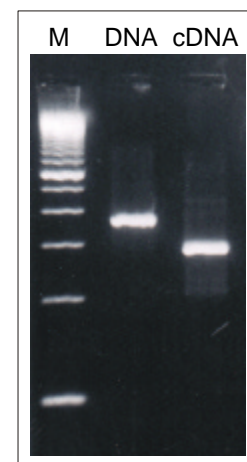
Formel 1: **Abhängigkeit zwischen Schwellenzyklus und eingesetzter Plasmidkonzentration in Wasser**

Die Charakteristika beider Tests sind vergleichbar: Die Nachweisgrenze liegt für beide Tests bei 10 ge/Test. Die Korrelation zwischen den Standardgeraden und den gemessenen Werten ist hoch ( $r^2 = 0,98$ ). Es liegt ein linearer Zusammenhang zwischen dem Schwellenzyklus und dem Logarithmus der Viruskonzentration vor, die Linearität erstreckt sich über einen Bereich von 10 bis  $10^7$  ge/Test, was einen relevanten Bereich für die HHV-6 Diagnostik darstellt. Wurden die Verdünnungsreihen der Plasmide nicht in Aqua bidest, sondern in 250 ng humaner DNA angefertigt, blieb die Linearität bei geringfügiger Abnahme der Korrelation ( $r^2 > 0,95$ ) erhalten. Die daraus resultierenden Standardgeraden müssen dementsprechend zur Berechnung der HHV-6 Konzentration im Hintergrund zellulärer DNA verwendet werden.

Wie sich zeigte, kann dieser Test auch zum Nachweis von HHV-6 cDNA verwendet werden. Wird cDNA infizierter Zellen eingesetzt, so erhält man analog dem DNA Nachweis spezifische Signale für die beiden Varianten A und B. Da eine Unterscheidung zwischen DNA und cDNA nicht möglich ist, muß die RNA Präparation jedoch absolut DNA frei sein.

### I.2.3 RT-PCR

Zum spezifischen Nachweis von HHV-6 RNA wurde ein Test etabliert, welcher durch den Einschluß eines Introns in das Amplikon anhand der Größe eine klare Unterscheidung zwischen amplifizierter DNA und amplifizierter cDNA zuläßt. Da zum Zeitpunkt der Etablierung nur 3 Introns von HHV-6 bekannt waren, wurde das größte Intron von 89 bp für diesen Test genutzt. Es befindet sich im Gen U12, welches für ein integrales Membranprotein noch unbekannter Funktion codiert. Nach Amplifikation mit den Primern U12for und U12back erhielt man mit



**Abbildung 18: Gelelektrophorese der PCR Produkte der HHV-6 RT-PCR. 2% Agarose-Gel**

cDNA ein Amplikon von 468 bp und mit DNA ein um 89 bp größeres Amplikon von 557 bp. Zur Senkung der Nachweisgrenze wurde ein dritter, eingerückter Primer U12back2 konstruiert und in einer semi-nested PCR mit U12out eingesetzt. Die Größe der resultierenden Amplikons betrug 278 bp für cDNA und 367 bp für DNA, was sich deutlich durch gelelektrophoretische Auftrennung nachweisen ließ (Abb. 18). Die Sensitivität dieser PCR war auch bei Verwendung des eingerückten Primers U12back2 unzureichend: So mußte die RNA Präparation von mindestens zu 20% infizierten Zellen erfolgen, damit eine nachweisbare Amplifikation möglich war. Außerdem ist diese PCR nicht in der Lage die beiden Varianten A und B zu unterscheiden.

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

Eine wichtige Voraussetzung für die Etablierung des NOD/SCID Mausmodells war, die Auswirkungen einer HHV-6 Infektion auf die nicht-transplantierte Maus selbst zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Versuchsansätze durchgeführt, bei denen unter anderem untersucht wurde, ob HHV-6 in Mauszellen eindringt und dort repliziert.

Um zu zeigen, daß das verwendete Virusmaterial für humane Zellen infektiös war, wurden bei allen Infektionsversuchen jeweils frisch stimulierte CB-MNC infiziert (Kontrollinfektion). Mit dem IFA konnte in diesen Kontrollinfektionen nach 5-6 Tagen kontrolliert werden, ob das Virusmaterial infektiös war.

### **II.1 Injektion von HHV-6 infizierten Zellen oder zellfreiem HHV-6**

18 NOD/SCID Mäuse wurden in 2 Gruppen I und II eingeteilt. Je 3 Mäuse der Gruppe I erhielten eine Injektion von  $5 \times 10^6$  HHV-6A bzw. HHV-6B infizierten CB-MNC (7d in Kultur, >70% infiziert) in die Schwanzvene. Als Kontrolle wurden 3 Mäusen  $5 \times 10^6$  nicht-infizierte CB-MNC injiziert, welche parallel zu den infizierten CB-MNC in Kultur gehalten wurden (Mock-Infektion). Die Mäuse in Gruppe II erhielten nach vergleichbarem Schema Injektionen von 300  $\mu$ L zellfreiem, virushaltigem Kulturüberstand ( $TCID_{50} \sim 10^3$ /mL) und als Kontrolle 300  $\mu$ L Überstand einer nicht infizierten CB-MNC Kultur (Mock-Infektion). Die Kontrollinfektion (s.o.) des verwendeten Virusmaterials wurde in diesem Versuch mit dem IFA nach 6 Tagen als positiv bewertet, d.h. den Mäusen wurden für humane Zellen infektiöse Viren injiziert.

### II.1.1 Einfluß von HHV-6 auf die Hämatopoese der NOD/SCID Maus

Nach 2, 4 und 8 Wochen wurden die Mäuse getötet. Bei der Biopsie konnten in Mäusen beider Gruppen nach HHV-6 Injektion keine pathologischen Veränderungen der Organe verglichen mit Mäusen nach CB-MNC Injektion bemerkt werden. Auch das jeweilige Blutbild zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Mäusen, die HHV-6 erhalten hatten und CB-MNC Mäusen, weder für HHV-6A noch für HHV-6B (Tab. 29). Für alle Mäuse lagen die Werte im Normbereich, was auf eine durch HHV-6 unbeeinflusste Hämatopoese schließen läßt.

**Tabelle 29: Blutbild von NOD/SCID Mäusen nach HHV-6 Injektion**

Parameter	W p.i.	Injektion Gruppe I infizierter Zellen			Injektion Gruppe II virushaltiger Überstands		
		Mock	HHV-6A	HHV-6B	Mock	HHV-6A	HHV-6B
WBC	2	3,0 ± 1,5	2,8 ± 0,5	3,4 ± 1,2	3,0 ± 1,5	2,5 ± 0,5	3,4 ± 0,9
	4	2,9 ± 1,5	3,3 ± 0,4	1,2 ± 0,0	4,9 ± 3,6	3,7 ± 1,0	3,0 ± 1,1
	8	1,5	1,3	1,2	2,4	1,2	1,5
RBC	2	7,9 ± 0,4	7,9 ± 0,3	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,4	7,9 ± 0,3	7,9 ±
	4	8,4 ± 0,1	8,1 ± 0,1	7,9 ± 0,1	7,7 ± 0,5	8,2 ± 0,1	8,1 ± 0,1
	8	8,8	8,6	8,6	7,9	8,6	7,78
PLT	2	14,9 ± 4,0	15,6 ± 1,4	17,2 ± 0,9	13,3 ± 4,0	15,6 ± 1,4	17,2 ±
	4	17,8 ± 0,0	16,1 ± 1,0	18,2 ± 0,1	11,8 ± 2,3	16,6 ± 3,1	17,4 ± 1,4
	8	17,8	16,9	17,5	10,1	15,9	14,4
HGB	2	13,3 ± 0,4	13,2 ± 0,5	13,2 ± 0,1	14,3 ± 0,4	13,2 ± 0,5	13,2 ±
	4	13,5 ± 0,1	13,2 ± 0,1	13,0 ± 0,4	12,7 ± 0,3	13,7 ± 0,1	13,6 ± 0,3
	8	14,0	13,7	14,0	13,4	14,0	12,5
HCT	2	47,0 ± 2,0	48,1 ± 4,0	45,2 ± 2,0	37,0 ± 2,0	48,1 ± 4,0	45,5 ±
	4	50,7 ± 2,7	51,9 ± 0,7	44,1 ± 0,7	44,1 ± 0,0	48,6 ± 6,0	51,2 ± 1,7
	8	44,8	43,0	42,7	42,1	43,0	37,8

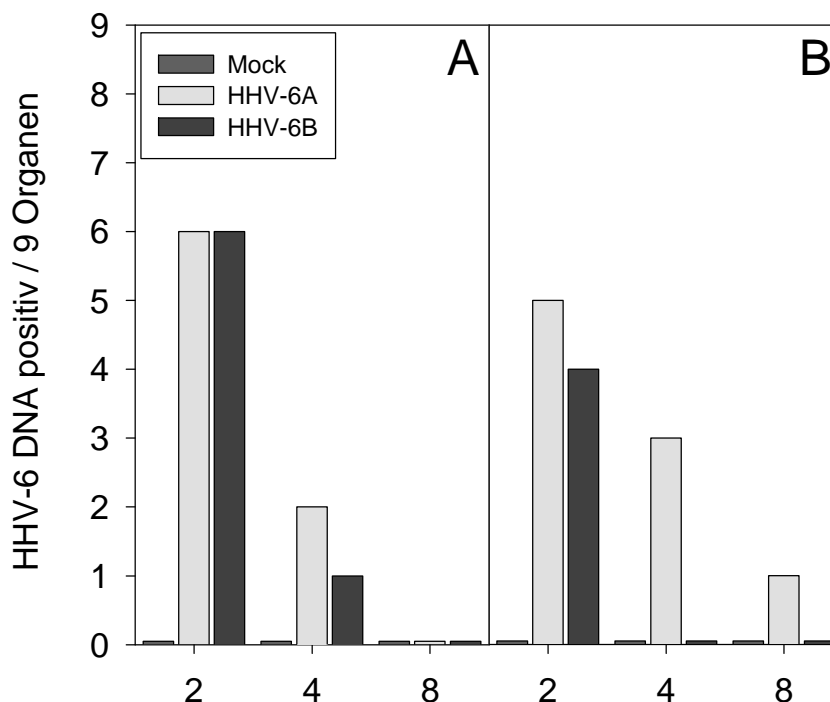
WBC: Weiße Blutzellen [ $10^3/\mu\text{L}$ ]; RBC: Rote Blutzellen [ $10^6/\mu\text{L}$ ]; PLT: Thrombocyten [ $10^5/\mu\text{L}$ ]; HGB: Hämoglobin [g/dL]; HCT: Hämatokrit [%]

### II.1.2 Nachweis von HHV-6 DNA und RNA

Zum Nachweis von HHV-6 DNA in Mäusen der Gruppen I und II, wurde zu jedem Untersuchungszeitpunkt nach der Biopsie aus Blut, Gehirn, Knochenmark, Leber, Lunge, Milz, Niere, Thymus und Urin DNA präpariert. Soweit möglich wurden 500 ng DNA mit der oben beschriebenen HHV-6 snPCR qualitativ nach HHV-6

DNA untersucht (die quantitative TM-PCR war zu diesem Zeitpunkt noch nicht etabliert). Als Amplifikationskontrolle wurde für alle Proben, außer für Urin, ein Fragment des murinen  $\beta$ -Aktin Gens amplifiziert.

In Mäusen der Gruppe I ließ sich 2 Wochen p.i. in 6/9 Organen jeweils HHV-6A und HHV-6B DNA nachweisen. Nach 4 und 8 Wochen sank dieser Anteil für HHV-6A auf 2/9 bzw. 0/9 untersuchten Proben, für HHV-6B auf 1/9 bzw. 0/9 untersuchten Proben (Abb. 19A). Ein Tropismus für bestimmte Organe der Maus konnte nicht



**Abbildung 19: Anteil HHV-6 DNA positiver Organe im zeitlichen Verlauf nach Injektion HHV-6 infizierter CB-MNC (Abb. 19A) und nach Injektion HHV-6-haltiger Kulturüberstände (Abb.19B)**

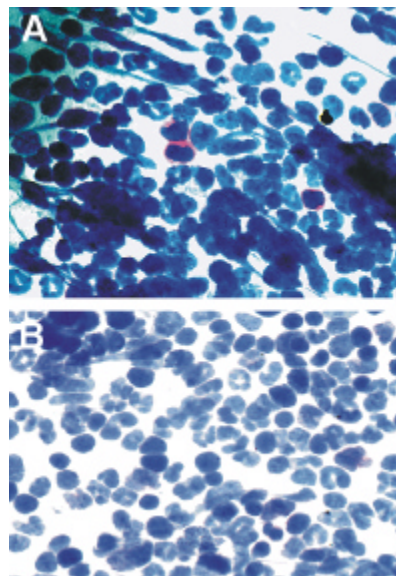
festgestellt werden. Vergleichbare Ergebnisse wurden in der Gruppe II nach Injektion von zellfreiem Virus beobachtet (Abb. 19B). HHV-6 DNA war mit zunehmender Zeit nach der Infektion weniger häufig in den Mäusen nachweisbar.

Von insgesamt 10 DNA positiven Organen wurde aus dem verbleibenden Material RNA präpariert und daraus cDNA synthetisiert. In keiner der Proben ließ sich mit der HHV-6 RT-PCR HHV-6 spezifische cDNA nachweisen. Als Kontrolle diente die Amplifikation murinen  $\beta$ -Aktins.

### II.1.3 HHV-6 Antigen Nachweis

Nach 2, 4 und 8 Wochen wurden Ausstriche des Knochenmarks aller Mäuse angefertigt. Die Ausstriche wurden mit mAb H-AR-2 und der APAAP, als sehr sensitiver Nachweismethode, gefärbt. HHV-6 Antigen war nur in wenigen Zellen in Knochenmarkausstrichen von Mäusen beider Gruppen, I und II, bereits 2 Wochen

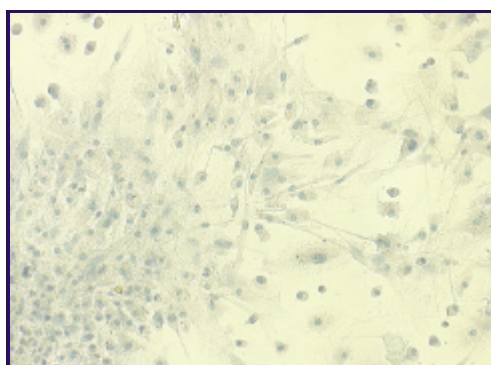
nach HHV-6 Injektion nachweisbar. Nach 4 Wochen und 8 Wochen sowie in Knochenmarkausstrichen von Kontrollmäusen war kein HHV-6 Antigen nachweisbar. Bei Injektion von HHV-6 infizierten CB-MNC (Gruppe I) war die Anzahl der Antigen-positiven Zellen im Vergleich zu zellfrei injiziertem Virus (Gruppe II) etwas geringer. Abbildung 20 zeigt exemplarisch APAAP gefärbte Knochenmarkausstriche nach zellfreier HHV-6B Injektion. In Kryoschnitten der Milz konnte kein HHV-6 Antigen nachgewiesen werden. Die Ko-Kultivierung dieser Maus-Knochenmark Zellen mit stimulierten CB-MNC führte zu keiner Infektion der humanen Zellen. Diese Daten zeigen, daß HHV-6 nicht nachweisbar im Knochenmark der NOD/SCID Maus repliziert. Insgesamt wurden 5 vergleichbare Versuche durchgeführt. Auch bei Wiederholung dieses Experiments wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt. Antigen positive Zellen konnten dabei nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 20:** APAAP Färbung von Maus-Knochenmarkausstrichen nach Injektion von zellfreiem HHV-6B (400x). A: 2 Wochen; B: 4

## II.2 Versuch der Infektion von NOD/SCID Maus Knochenmarkszellen *in vitro*

Knochenmark von 6 Wochen alten, nicht-transplantierten NOD/SCID Mäusen wurde in Kultur genommen und 14 Tage kultiviert. Das Medium wurde abgenommen und der Zellrasen mit je 1 mL virushaltigen Zellkulturüberständen (TCID<sub>50</sub>: 10<sup>3</sup>/mL) HHV-6A und HHV-6B infizierter CB-MNC Kulturen überschichtet. Nach vier Stunden wurden 2 mL LTBMCMedium zugegeben und die Zellen für eine Woche unter Standardbedingungen kultiviert. Anschließend erfolgte eine APAAP Färbung mit dem mAb H-AR-2. Obwohl die Kontrollinfektion von CB-MNC nach 6 Tagen HHV-6 Antigen positiv war, zeigten die NOD/SCID Maus Knochenmarkszellen weder eine Veränderung ihrer Morphologie, noch konnte HHV-6 Antigen nachgewiesen werden. Keine der beiden HHV-6 Varianten führte zu einer nachweisbaren Infektion. Abbildung 21 zeigt eine LTBMCMedium nach Inkubation mit HHV-6A Kulturüberstand. Diese Ergebnisse wurden mit der Maus



**Abbildung 21:** LTBMCMedium einer NOD/SCID Maus 6d nach Inkubation mit HHV-6B. APAAP Färbung (200x).



Zelllinie B16-FO reproduziert. Auch diese Zellen zeigten weder eine Veränderung der Morphologie, noch waren 6 und 10 Tage nach der Inkubation mit HHV-6 Antigen positive Zellen nachweisbar.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß HHV-6 für die NOD/SCID Maus nicht pathogen ist. Darüber hinaus ist eine HHV-6 Replikation in Zellen der NOD/SCID Maus nicht nachweisbar. Auch *in vitro* war eine Infektion von Maus Zellen nicht möglich.

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

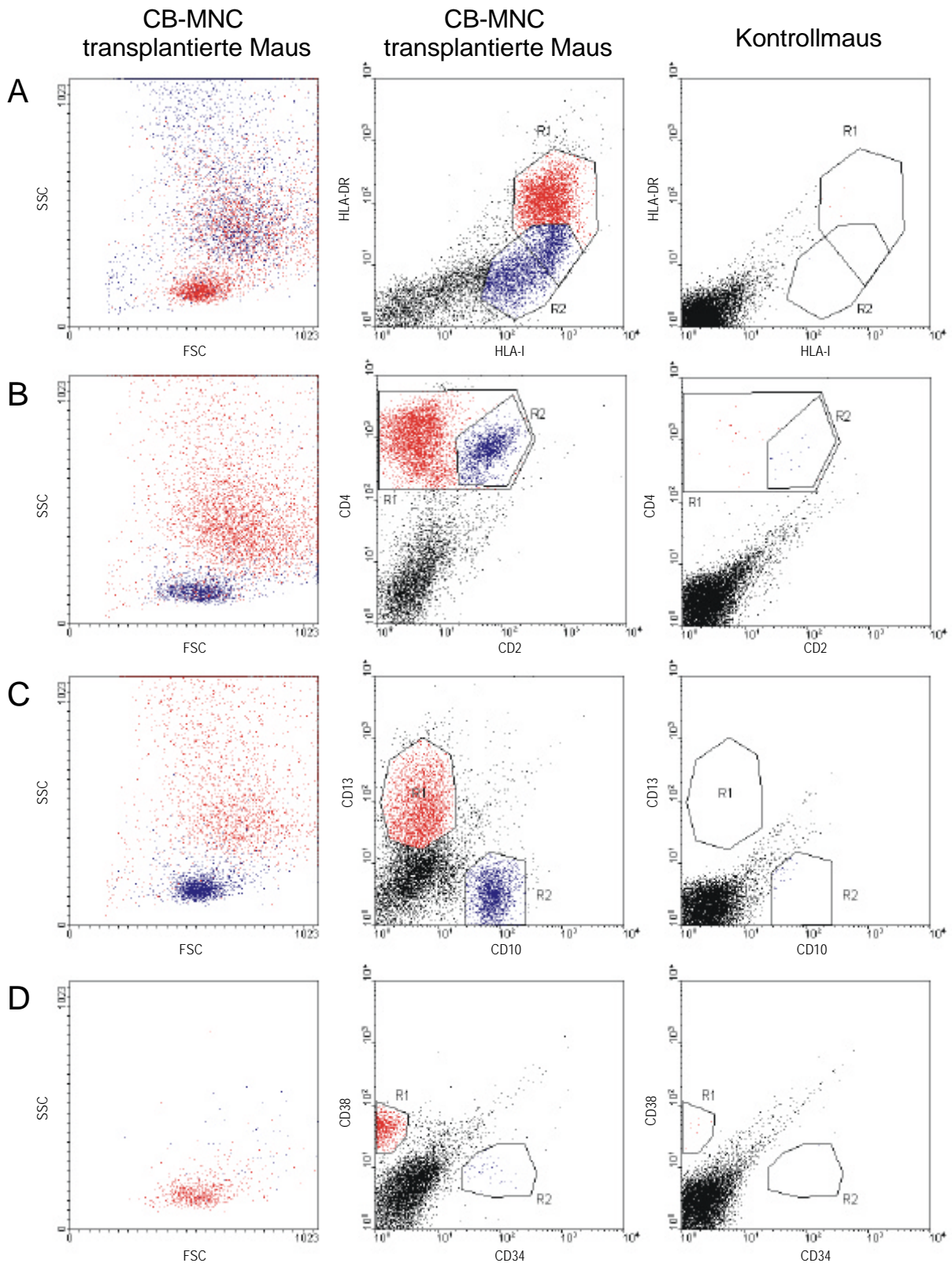
Zuerst wurden Art und Ausmaß der humanen Hämatopoese in mit CB Zellen transplantierten NOD/SCID Mäusen untersucht und bezüglich einer möglichst hohen Produktion humaner Zellen in der Maus optimiert. Dabei wurden die in Tabelle 30 genannten Parameter variiert und deren Einfluß mit verschiedenen Methoden nachgewiesen.

**Tabelle 30: Variation für die Transplantation relevanter Parameter**

Variierter Parameter		Untersuchter Parameter	Methode
Xenotransplantat	CB-MNC	<i>Anteil und Art humaner hämatopoetischer und nicht-hämatopoetischer Zellen in</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• FACS</li> <li>• Immuncytochemie</li> <li>• PCR</li> </ul>
	CB-CD34 <sup>+</sup> Zellen		
	hIL-3	• <i>KM, Blut und Milz</i>	
Supplementierung	hG-CSF	• <i>LTBMC</i>	
		hIL-7	
Zeit	6-12 Wochen		

#### III.1 Transplantation von CB-MNC

Die Transplantation der Zellen erfolgte in 6 Wochen alte bestrahlte NOD/SCID Mäuse, wobei nur Zellen verwendet wurden, die nicht älter als 6-8 Stunden waren. Obwohl NOD/SCID Mäuse ohnehin ein extrem eingeschränktes Immunsystem besitzen, soll durch die Bestrahlung das Ansiedeln humaner PHSZ im Knochenmark erleichtert werden. In einem ersten Versuch konnte gezeigt werden, daß nach Injektion von Ficoll-angereicherten CB-MNC humane Zellen in Knochenmark, Blut und Milz der Mäuse nachweisbar sind (HLA-I<sup>+</sup>). Abbildung 22 zeigt exemplarisch die FACS Analyse von Knochenmark einer mit CB-MNC transplantierten Maus 9 Wochen p.t.. Die untersuchten humanen CD (*engl.* Cluster of Differentiation) Antigene sind im Hintergrund muriner Zellen deutlich erkennbar.



**Abbildung 22: Exemplarische Darstellung von Dot-Plots der FACS Analyse von Knochenmark einer CB-MNC transplantierten NOD/SCID Maus (links, Mitte) 12 Wochen p.t. Als Vergleich ist die parallele Untersuchung des Knochenmarks einer nicht-transplantierten Kontrollmaus gezeigt. Neben dem FSC/SSC Plot, der Aussagen über Größe und Granularität der Zellen erlaubt (links), sind 4 verschiedene Fluoreszenzfärbungen gezeigt (A-D). Humane Zellen sind in der transplantierten Maus deutlich zu identifizieren.**

Wie auch in weiteren vergleichbaren Versuchen gezeigt wurde, ist nach Transplantation von CB-MNC das Maximum der Produktion humaner Zellen im Knochenmark nach 7 bis 9 Wochen p.t. erreicht, bleibt dann bis zur 13. Woche p.t. konstant. Es überwiegen B-lymphoide Vorläuferzellen ( $CD10^+$ ,  $CD19^+$ ,  $CD38^+$ ), der Anteil myeloider Zellen ist dagegen geringer ( $CD13^+$ ,  $CD33^+$ ). Potentielle PHSZ ( $CD34^+38^-$ ) sind wie lymphoide Vorläuferzellen ( $CD34^+/38^+$ ) und T-lymphoide und NK-Zell-Vorläuferzellen ( $CD2^+$ ) ebenfalls nachweisbar. Reife T-Lymphozyten ( $CD3^+$ ) werden nur in sehr geringer Menge beobachtet. Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse eines von drei vergleichbar durchgeführten Versuchen für Knochenmark (Abb. 23A), Blut (Abb. 23B) und Milz (Abb. 23C). Der höchste Anteil humaner Zellen konnte im Knochenmark beobachtet werden, der niedrigste im Blut.

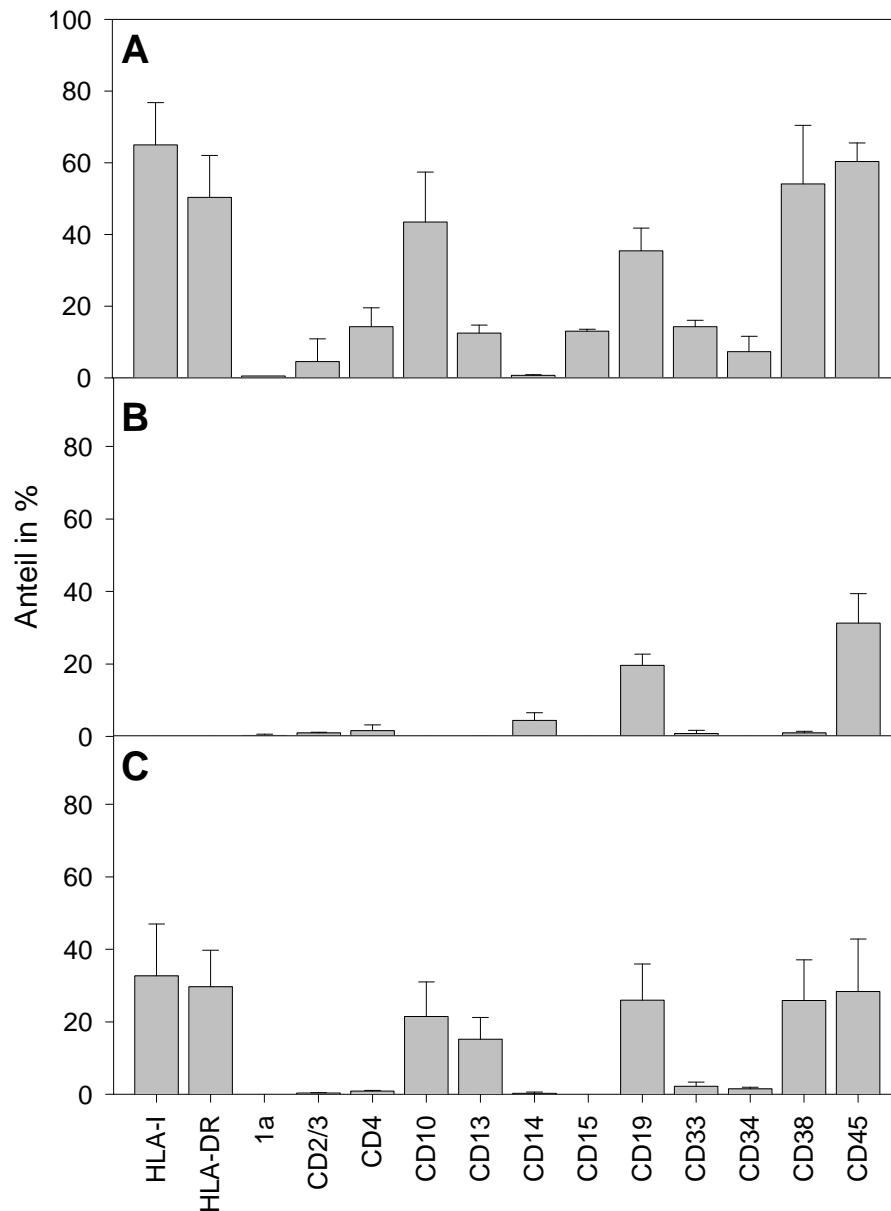
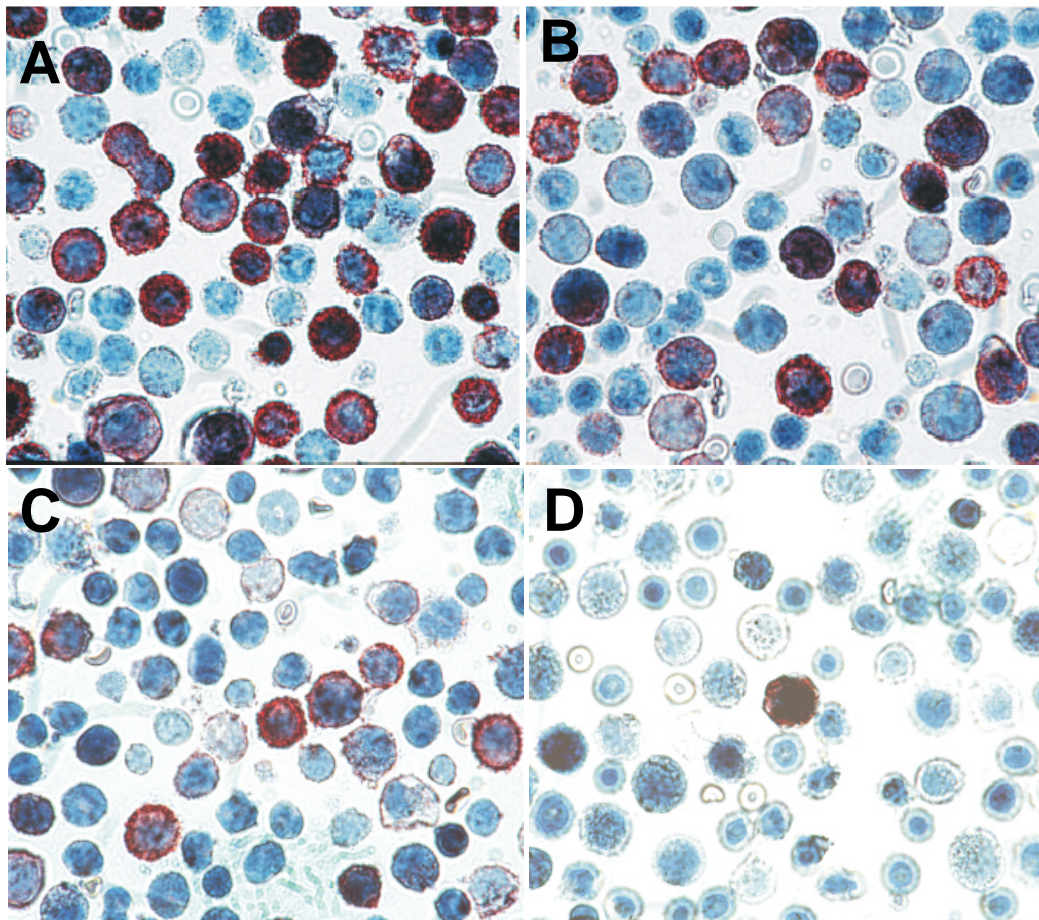


Abbildung 23: Nachweis einer Multilinen-Hämatopoese in Knochenmark (Abb. 23A), Blut (Abb. 23B) und der Milz (Abb. 23C) einer NOD/SCID Maus 12 Wochen p.t.

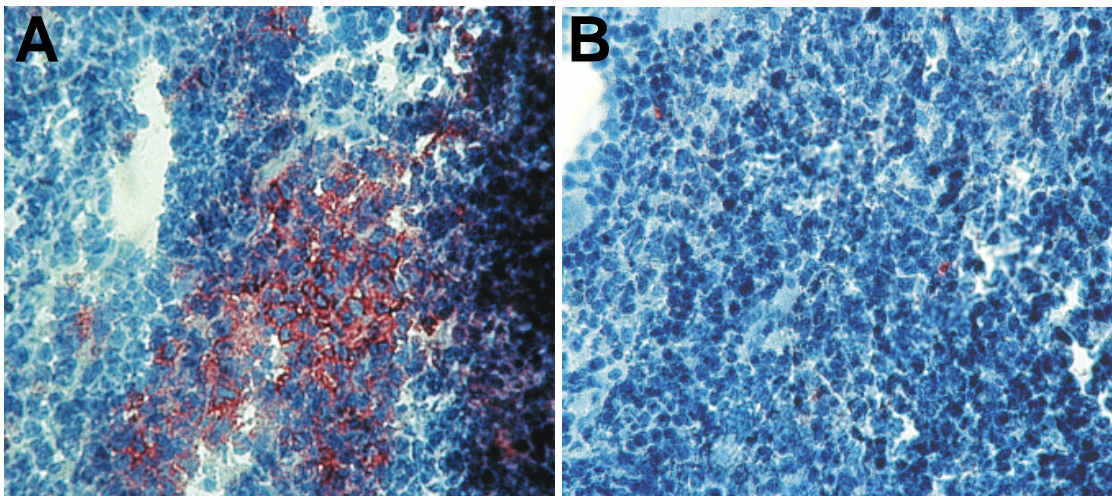
Die mit der FACS Analyse ermittelten Ergebnisse konnten durch immunocytochemische Färbung (POX) mit spezifischen mAb gegen humane CD Antigene bestätigt werden. Neben dem Nachweis hämatopoetischer Zellen war mit der POX Färbung der Nachweis nicht-hämatopoetischer, stromaler Zellen (NHZ), wie Endothelzellen und Fibroblasten, in Knochenmark und Milz transplantierte Mäuse möglich. Dabei erwies sich die POX Färbung als vorteilhaft, da sie zusätzliche Information über die Morphologie der Zellen liefert und so eine bessere Charakterisierung mit höherer Spezifität erlaubte. Weil die POX Färbung darüber hinaus als sensitiver als die FACS Analyse gilt, konnten durch den Einsatz von diversen mAb gegen nicht-hämatopoetische Zellen (siehe Tabelle 19) auch diese, in geringer Anzahl vorhandenen, Zellen nachgewiesen werden. Abbildung 24 zeigt exemplarisch die POX Färbung von Knochenmark-Einzelzell-Suspensionen einer CB-MNC transplantierten Maus 9 Wochen p.t..

Neben HLA-I als Marker humaner Zellen (Abb. 24A) ist CD45 als Marker humaner hämatopoetischer Zellen (Abb. 24B), sowie EN4 (Abb. 24C) und vWF (Abb. 24D) als Marker für NHZ gezeigt.



**Abbildung 24:** POX Färbung von Einzelzellensuspensionen des Knochenmarks einer CB-MNC transplantierten NOD/SCID Maus 9 Wochen p.t.. Gezeigt sind HLA-I (Abb. 24A), CD45 (Abb. 24B), EN4 (Abb. 24C) und vWF (Abb. 24D).

Die Färbung von Milz-Einzelzellsuspensionen resultierte häufig in niedrigeren Anteilen nicht-hämatopoetischer humaner Zellen als die Färbung von Milz-Kryoschnitten. Durch die Art der Milz-Aufarbeitung für die Vereinzelnung der Zellen, das Pressen durch ein Zellsieb, scheint es zu einer Abreicherung humaner adhärenter Zellen zu kommen. Deshalb wurden in der Folge nur noch Kryo-Schnitte der Milz gefärbt. Dabei war, wie in Abbildung 25 gezeigt, häufig ein inselartiges Wachstum humaner Zellen im Milzgewebe zu bemerken. Fibroblasten und Endothelzellen wurden mit den mAb Fib3 und EN-4 nachgewiesen.

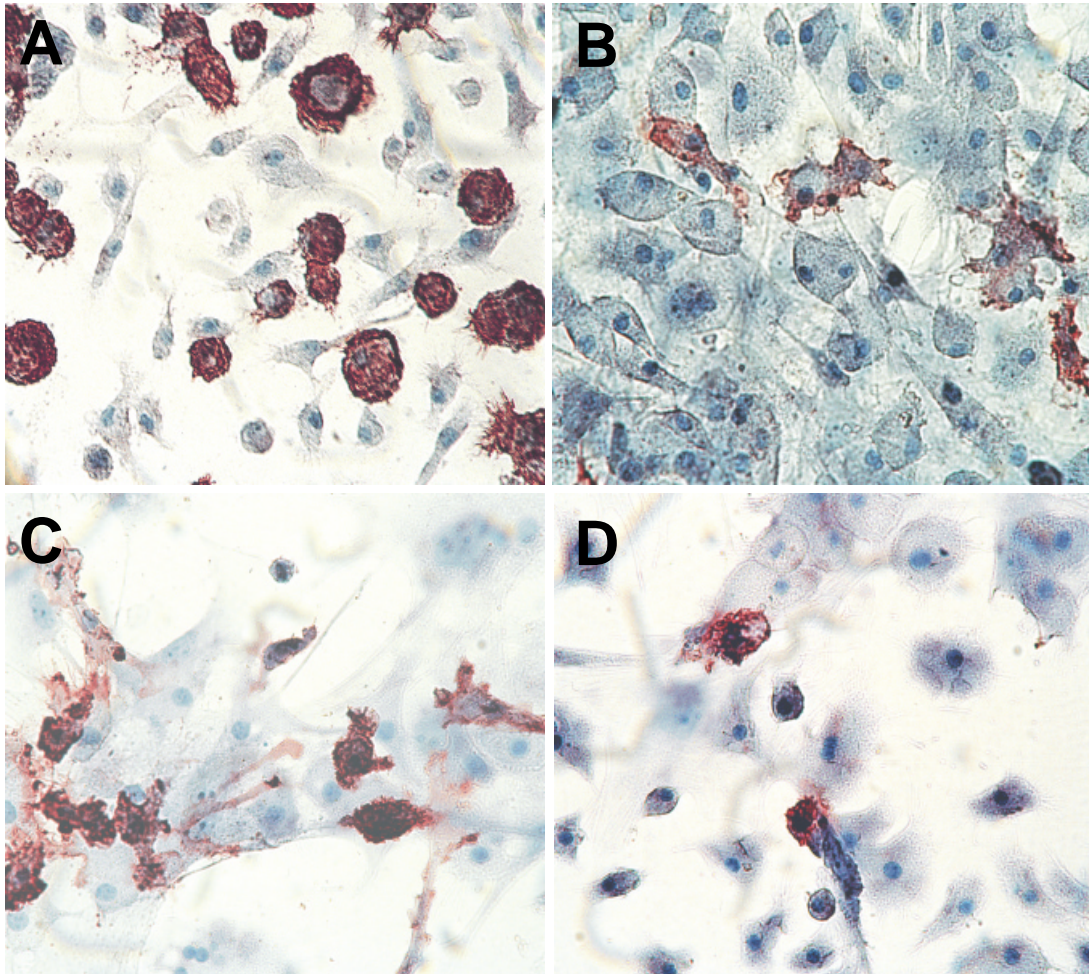


**Abbildung 25: POX Färbung von Milz-Kryoschnitten einer CB-MNC transplantierten NOD/SCID Maus 9 Wochen p.t.** Gezeigt sind HLA-I (Abb. 25A) und EN4 (Abb. 24B).

Zur weiteren Charakterisierung der in der chimären Maus gebildeten humanen Zellen wurden Langzeit-Kulturen mit Knochenmarkzellen (*engl.* long-term bone marrow culture, LTBM) und Milzzellen (*engl.* long-term spleen culture, LTSC) transplantierte Mäuse angelegt. In diesen Kulturen kann das Multidifferenzierungspotential hämatopoetischer und vor allem nicht-hämatopoetische Zellen der humanen Vorläuferzellen besser ausgeschöpft werden als in den Organen selbst. Außerdem kann durch Stimulation mit VEGF die Expression von dessen Rezeptor (VEGF-R2, KDR) induziert und so sein Anteil deutlicher erkennbar gemacht werden.

Während in LTBM nach 14-21 Tagen ein konfluenten Rasen spindelförmiger Zellen deutlich erkennbar war, kam es bei LTSC zu keinem Auswachsen eines konfluenten Zellrasens. Abbildung 26 zeigt mit den mAb  $\alpha$ -HLA-I, R4-23, EN4 und vWF gefärbte LTBM, in der die Morphologie der Endothelzellen sehr gut erkennbar wird.

Der Nachweis des Chemokin-Rezeptors CXCR4 war weder mit der FACS Analyse, noch mit der POX Färbung möglich. Der verwendete mAb war nicht human spezifisch.



**Abbildung 26: POX Färbung von LTBMK einer CB-MNC transplantierten NOD/SCID Maus nach 20 Tagen in Kultur.** Gezeigt sind HLA-I (Abb. 26A), R4-23 (Abb. 26B), EN4 (Abb. 26C) und vWF (Abb. 26D).

Neben den bisher beschriebenen Methoden wurde eine semi-quantitative PCR zum Nachweis humaner DNA in Organen transplantierten NOD/SCID Mäuse eingesetzt. Diese PCR wurde von Michael Becker in der Arbeitsgruppe Experimentelle Pharmakologie am Max-Delbrück Zentrum entwickelt. Bei dieser Methode wird ein Fragment human-spezifischer  $\alpha$ -Satelliten DNA des Chromosoms 17 amplifiziert. Die Kalibrierung erfolgt wie unter I.6.3.3 beschrieben. Mit Hilfe dieser PCR wurde der Anteil humaner DNA im Blut von NOD/SCID Mäusen im Verlaufe eines Versuchs kontrolliert. Nach diesen Ergebnissen konnte dann entschieden werden, wann ein Versuch beendet wird und die Mäuse analysiert werden.

Nach den hier gezeigten Ergebnissen läßt sich zusammenfassen, daß die Transplantation von CB-MNC in allen Versuchen zur Bildung einer Multiliniären-Hämatopoese mit Produktion verschiedener humaner hämatopoetischer Zellen führte. Aus den sich im Knochenmark ansiedelnden Vorläuferzellen entstehen neben den hämatopoetischen Zellen auch nicht-hämatopoetische, stromale Zellen, die auch in Kulturen vermehrt werden können.

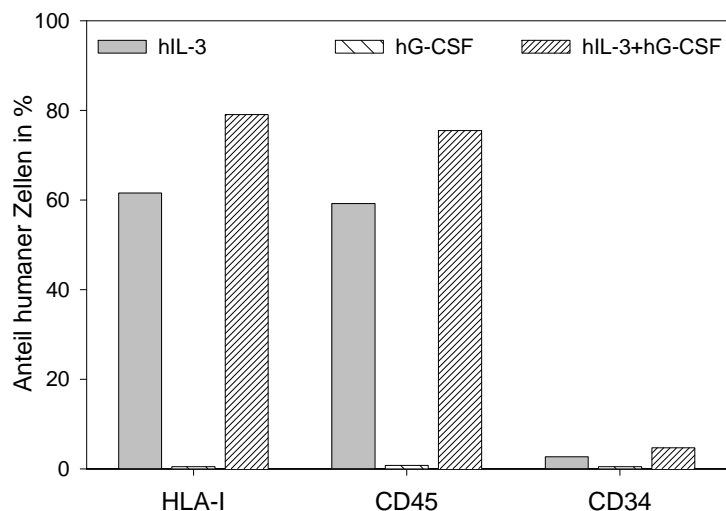
### III.1.1 Ko-Transplantation von Cytokin produzierenden Zellen

Zur weiteren Optimierung wurden die NOD/SCID Mäuse nach Transplantation von CB-MNC mit humanen Cytokinen supplementiert. Dabei wurden die Cytokine nicht in regelmäßigen Abständen i.v. appliziert, sondern Rattenzelllinien, welche mit den entsprechenden Cytokin-Genen transfiziert waren, als Ko-Transplantat in die Mäuse gesetzt. Diese Ko-Transplantate wurden von der Maus nicht abgestoßen, sondern exprimierten und sekretierten konstitutiv das entsprechende humane Cytokin. Durch diese Verfahrensweise ist eine preiswerte und gleichmäßige Cytokin Produktion gewährleistet. Ko-Transplantate für die folgenden humanen Cytokine wurden eingesetzt: Interleukin-2 (hIL-2), hIL-3, hIL-7 und Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor (G-CSF) und deren Einfluß auf die humane Hämatopoese in der chimären Maus beobachtet.

IL-2 Ko-Transplantate wuchsen nicht an und produzierten kein IL-2. Obwohl IL-7 Ko-Transplantate vaskularisiert wurden, war kein fördernder Effekt auf die humane Hämatopoese zu bemerken; der IL-7 Spiegel im Blut der Mäuse wurde nicht bestimmt. IL-3, als hämatopoetisch aktives Cytokin, zeigte im Mittel einen fördernden Effekt auf das Engraftment humaner Zellen. Im Vergleich zu CB-MNC transplantierten Mäusen ohne Ko-Transplantat war der Anteil myeloider Zellen unter dem Einfluß von IL-3

höher und schon nach 6 Wochen wurden vergleichbar hohe Anteile humaner Zellen erreicht, wie in Mäusen ohne IL-3 Ko-Transplantat nach 7-9 Wochen. Dafür war die Produktion humaner Zellen im Knochenmark

schneller erschöpft und schon nach 11 Wochen war

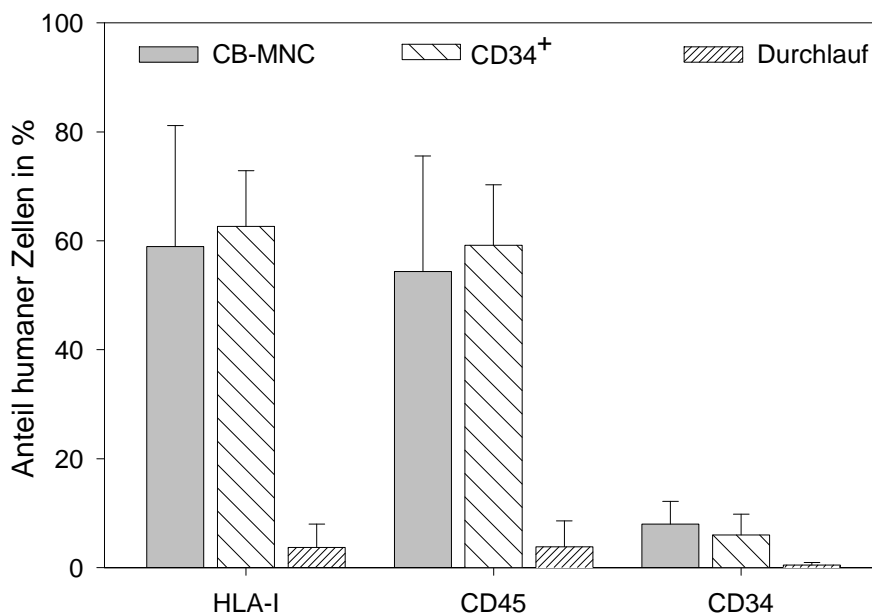


**Abbildung 27: Einfluß von hIL-3 und hG-CSF Ko-Transplantaten auf die Produktion humaner Zellen in CB-MNC transplantierten NOD/SCID Mäusen 9 Wochen p.t..** Gezeigt ist der Anteil humaner Zellen im Knochenmark.

der Anteil humaner Zellen dort stark reduziert, bei gleichbleibend hohem Ausstoß humaner Zellen in Milz und Blut. G-CSF dagegen hatte allein keinen Einfluß, zeigte jedoch in Kombination mit IL-3 eine geringe Steigerung des Anteils humaner Zellen gegenüber einem IL-3 Zusatz allein. Da humanes G-CSF mit murinem G-CSF kreuzreaktiv ist, kann ein Einfluß auf die murine Hämatopoese angenommen werden. Abbildung 27 macht die Unterschiede im Anteil humaner Zellen von CB-MNC transplantierten Mäusen deutlich, welchen entweder IL-3, G-CSF oder IL-3 und G-CSF zugesetzt wurde.

### III.2 Transplantation von CB-CD34<sup>+</sup> Zellen

Zur Zeit wird davon ausgegangen, daß die PHSZ sich in der CD34<sup>+</sup> Fraktion von CB befindet. Deshalb wurden CB-MNC aus CB präpariert und aus einem Aliquot davon mit Hilfe der MACS Methode CD34<sup>+</sup> Zellen angereichert (siehe B.I.1.3). Die Reinheit der CD34<sup>+</sup> betrug nach FACS Analyse ~70%. Der Durchlauf der MACS Anreicherung, die CD34<sup>+</sup> abgereicherte Fraktion, wurde ebenfalls aufgehoben. Diese 3 Zellfraktionen wurden in bestrahlte NOD/SCID Mäuse transplantiert. Alle Mäuse erhielten ein IL-3 produzierendes Ko-Transplantat. Die Ergebnisse dieses Vergleichs sind in Abbildung 28 gezeigt.



**Abbildung 28: Anteil humaner Zellen nach FACS Analyse im Knochenmark von NOD/SCID Mäusen nach Transplantation von  $1 \times 10^7$  CB-MNC (n=7),  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup> Zellen (n=15) und  $1 \times 10^7$  Zellen des Durchlaufes der Säulenanreicherung der CD34<sup>+</sup> Zellen (CD34<sup>+</sup> abgereicherte Fraktion, n=6)**

Während nach Transplantation von CD34<sup>+</sup> Zellen der Anteil humaner Zellen nicht signifikant größer ist als nach Transplantation von CB-MNC ( $p=0,94$ ), führte die DL Fraktion zu keiner deutlichen Produktion humaner Zellen. Daß es dabei überhaupt



zur Bildung humaner Zellen kam, kann durch eine unvollständige Markierung der CD34<sup>+</sup> Zellen bei der MACS Anreicherung erklärt werden, wodurch noch CD34<sup>+</sup> Zellen im DL enthalten blieben. Die Transplantation von CD34<sup>+</sup> Zellen führte zu einer nicht signifikanten Erhöhung myeloider Vorläuferzellen im Verhältnis zu B-lymphoiden Vorläuferzellen (p=0,86).

Um neben dem Anteil humaner Zellen deren Expansion zu bestimmen, kann man den Expansionsfaktor (ExpF) für humane Zellen bezogen auf die Anzahl der transplantierten humanen Zellen oder CD34<sup>+</sup> Zellen berechnen. Dabei wird davon ausgegangen, daß ein Mausfemur 8,5% des gesamten Knochenmarks einer Maus enthält. Ein Femur enthält durchschnittlich  $1 \times 10^7$  Zellen, woraus man für das gesamte Knochenmark einer Maus im Durchschnitt  $1,15 \times 10^8$  Zellen berechnen kann. Wird der Anteil HLA-I positiver Zellen im Knochenmark auf 50% bestimmt, entspricht das ungefähr  $5,5 \times 10^7$  Zellen. Bei  $1 \times 10^7$  transplantierten Zellen mit einem CD34<sup>+</sup> Gehalt von 1%, kann man so den Expansionsfaktor für die gesamten transplantierten Zellen als  $\text{ExpF}_{\text{Ges}}=5,5$  und bezogen auf CD34<sup>+</sup> Zellen als  $\text{ExpF}_{\text{CD34}}=550$  berechnen. Die allgemeine Formel zur Berechnung der Expansion lautet:

$$\text{ExpF} = \frac{11,76 \times \text{ZZ}(\text{Femur}) \times \% \text{HU}}{\text{ZZ}(\text{TX})}$$

**Formel 2:** Berechnung des Expansionsfaktors humaner Zellen in der NOD/SCID Maus

mit ZZ(Femur): Gesamtzahl der Zellen in einem Femur, %HU: Anteil humaner Zellen und ZZ(TX): Anzahl der transplantierten Zellen.

Berechnet man auf diese Weise den jeweiligen Expansionsfaktor für CB-MNC und CD34<sup>+</sup> transplantierte Mäuse (Tab. 31), wird deutlich, das, bezogen auf die CD34<sup>+</sup> Zellzahl, die Transplantation von CD34<sup>+</sup> Zellen zu einer höheren, jedoch nicht signifikant erhöhten Produktion humaner Zellen im Knochenmark von NOD/SCID Mäusen führt, verglichen mit CB-MNC (p=0,76). Davon ausgehend,

**Tabelle 31: Expansionsfaktoren humaner Zellen in NOD/SCID Mäusen**

Transplantat	ExpF <sub>Ges</sub>	ExpF <sub>CD34</sub>
1x10 <sup>7</sup> CB-MNC	6,9 ± 2,6	641,0 ± 265,2
2x10 <sup>7</sup> CB-MNC	2,9 ± 1,0	382,4 ± 142,5
1x10 <sup>5</sup> CD34 <sup>+</sup>	737,0 ± 117,9	819,9 ± 132,9

daß die Anzahl transplantierte PHSZ vergleichbar ist, scheint es zu einem verbesserten Einnisten von PHSZ im murinen Knochenmark zu kommen, wenn weniger Zellen transplantiert werden. Dies wurde durch eine Verdopplung der CB-MNC Transplantatdosis auf  $2 \times 10^7$  Zellen bestätigt, was eher zu einer reduzierten

Expansion humaner Zellen führte. Bezogen auf die Gesamtzahl humaner Zellen ist der Unterschied zwischen CB-MNC und CD34<sup>+</sup> Zellen besonders deutlich, da 100 mal weniger CD34<sup>+</sup> Zellen als CB-MNC transplantiert wurden, was in einer ~100 mal höheren Expansion resultiert. Tabelle 31 faßt die Expansionsfaktoren zusammen.

### III.2.1 Ko-Transplantation Cytokin produzierender Zellen bei CD34<sup>+</sup> Transplantation

Da bekannt war, daß bei Transplantation von CD34<sup>+</sup> Zellen eine Supplementierung mit humanen Cytokinen erforderlich ist, wurde bei derartig transplantierten Mäusen routinemäßig die mit dem humanen IL-3 Gen transfizierte Rattenzelllinie Rat-IL-3 ko-transplantiert. Weiterhin wurde untersucht, ob die gleichzeitige Ko-Transplantation hG-CSF produzierender Zellen einen verstärkenden Effekt hat, wie es bei der Transplantation von CB-MNC beobachtet werden konnte. Zu diesem Zweck wurden aus CB mit Hilfe der MACS Methode CD34<sup>+</sup> Zellen angereichert und  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup> Zellen in bestrahlte NOD/SCID Mäuse transplantiert. Allen Mäusen wurde ein hIL-3 produzierendes Ko-Transplantat gesetzt, der Hälfte der Mäuse zusätzlich ein hG-CSF produzierendes Ko-Transplantat. Im Knochenmark dieser hIL-3/hG-CSF transplantierten Mäuse war die Produktion humaner Zellen unwesentlich niedriger als bei alleiniger Ko-Transplantation von IL-3 produzierenden Zellen (Abb. 29), auch in Blut und Milz dieser Tiere war der Unterschied gering. Darüber hinaus war der Anteil myeloider und lymphoider Vorläuferzellen in beiden Gruppen in Knochenmark, Blut und Milz jeweils vergleichbar.

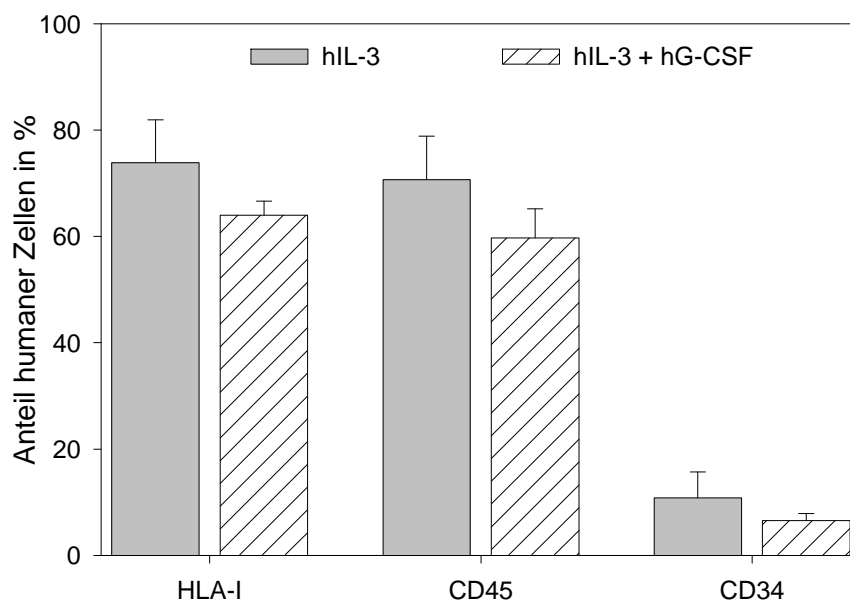
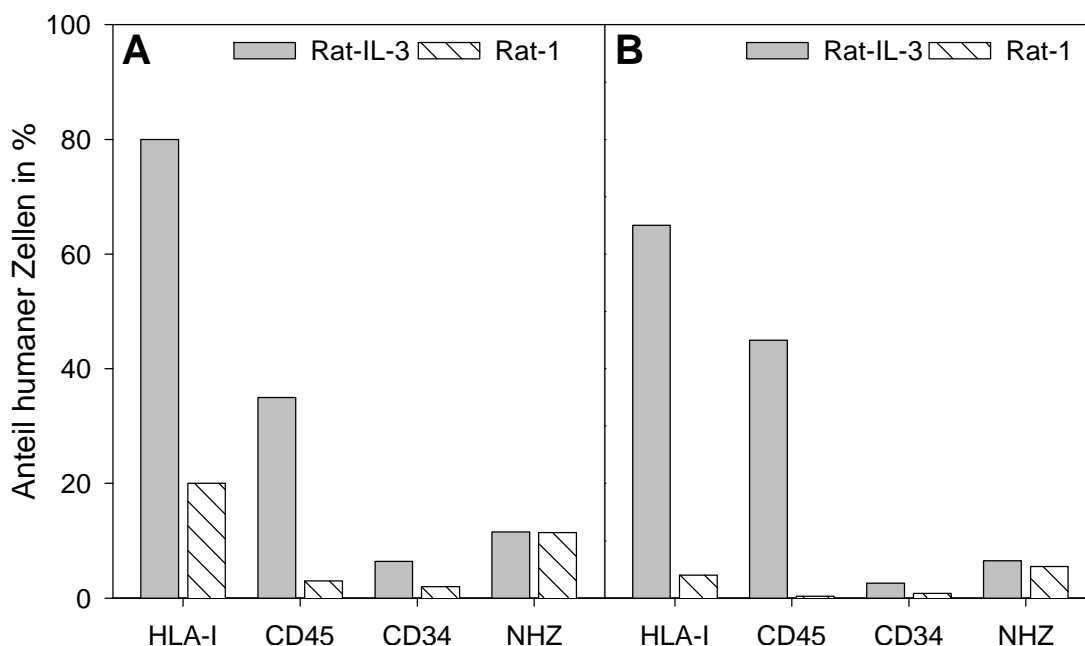


Abbildung 29: Anteil humaner Zellen nach FACS Analyse im Knochenmark CD34<sup>+</sup> transplantiert NOD/SCID Mäuse nach Ko-Transplantation von hIL-3 und hG-CSF produzierenden Zelllinien (n=3).

Da die Ko-Transplantate nach kurzer Zeit in der Maus vaskularisiert werden, war ein Hämatoopoese fördernder Einfluß auf das Engraftment durch Cytokinproduktion der nicht hIL-3 transfizierten Rattenzelllinie Rat-1 nicht auszuschließen. Um deren Einfluß zu bestimmen, wurden Mäuse mit CD34<sup>+</sup> Zellen aus CB transplantiert und entweder die nicht transfizierte Rattenzelllinie Rat-1 oder die daraus entstandene hIL-3 produzierende transfizierte Rattenzelllinie Rat-IL-3 ko-transplantiert. Da in diesen Versuchen neben den humanen hämatopoetischen Zellen auch stromale, nicht-hämatopoetische Zellen untersucht werden sollten, wurden Knochenmark und Milz

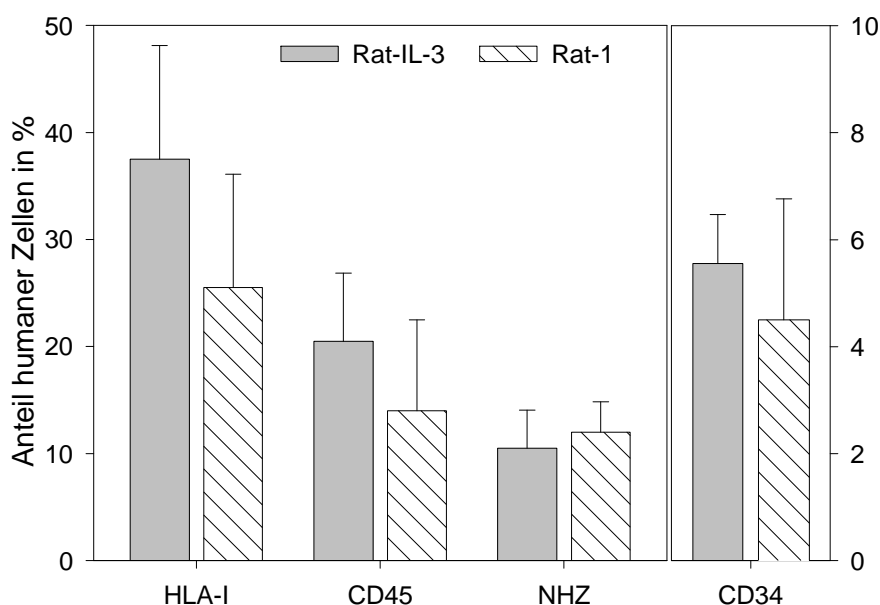


**Abbildung 30: Anteil humaner Zellen nach POX Färbung im Knochenmark von NOD/SCID Mäusen nach Transplantation von CD34<sup>+</sup> Zellen.** Als Ko-Transplantate wurden Rat-IL3 und Rat-1 verglichen. Abb. 30A zeigt die Ergebnisse 7 Wochen p.t., Abb. 30B die Ergebnisse 9 Wochen p.t..

zusätzlich mit der POX Färbung untersucht. Es zeigte sich, daß der Anteil humaner Zellen (HLA-I<sup>+</sup>) im Knochenmark bei Rat-IL-3 ko-transplantierten Mäusen nach 7 Wochen deutlich größer war, als bei Rat-1 ko-transplantierten Mäusen (Abb. 30 A). Auch hämatopoetische Zellen (CD45<sup>+</sup>) und potentielle PHSZ (CD34<sup>+</sup>) Zellen waren in Mäusen mit Rat-IL-3 Ko-Transplantaten vermehrt nachweisbar. Bei den NHZ, hier mit den mAb KDR, vWF und EN4 nachgewiesen, war jedoch kein Unterschied zu beobachten. Nach 9 Wochen konnten diese Ergebnisse bestätigt werden, wobei in Mäusen mit Rat-1 Ko-Transplantat nahezu keine humanen hämatopoetischen Zellen mehr nachweisbar waren. Zwar war auch in Rat-IL-3 Mäusen der Anteil humaner hämatopoetischer Zellen rückläufig, jedoch in weitaus geringerem Ausmaß. Zu beiden Zeitpunkten waren jedoch keine deutlichen Unterschiede beim Anteil der NHZ zu bemerken. Offensichtlich stimuliert hIL-3 lediglich die Bildung hämatopoetischer Zellen, während es zu keiner verstärkten

Bildung von humanen NHZ kommt. Weiterhin ist in diesem Versuch gut erkennbar, daß die humane Hämatopoese in der NOD/SCID Mäusen nach Transplantation von CD34<sup>+</sup> Zellen in der 9. Woche p.t. bereits rückläufig ist.

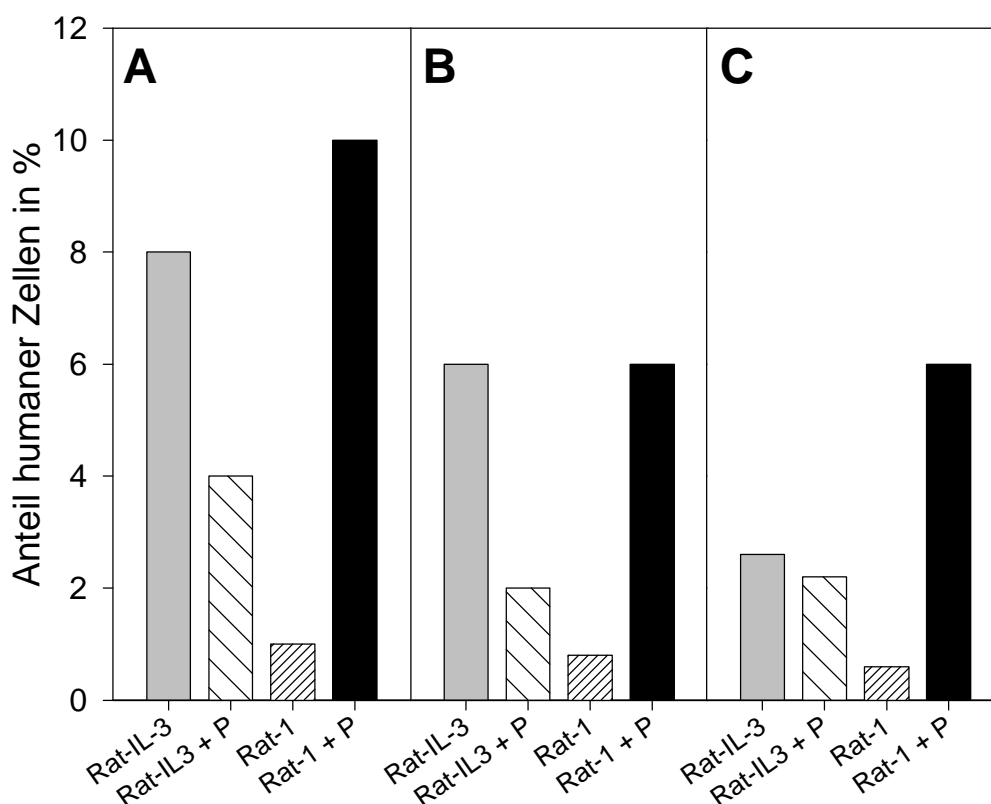
Mit Knochenmarkzellen von diesen Rat-1 und Rat-IL-3 Mäusen wurden ebenfalls LT BMC angelegt. Nach 14 Tagen in Kultur erfolgte die POX Färbung. Genau wie im Knochenmark der Mäuse war der Anteil humaner hämatopoetischer Zellen in LT BMC von Rat-IL-3 Mäusen höher als in LT BMC von Rat-1 Mäusen. Dieser Unterschied war jedoch in LT BMC nicht mehr so deutlich wie in den Mäusen selber. Auch hier zeigte sich, daß kein Unterschied in der Produktion von NHZ zwischen LT BMC aus Rat-IL-3 und LT BMC aus Rat-1 Mäusen zu bemerken war. Abbildung 31 zeigt den Anteil von HLA-I<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> und NHZ in LT BMC dieser Mäuse.



**Abbildung 31: Anteil humaner Zellen nach POX Färbung von LT BMC.** Verglichen sind LT BMC von NOD/SCID Mäusen mit Rat-IL-3 und Rat-1 Ko-Transplantaten (n=3).

Von einem weiteren, vollkommen identisch durchgeführten Versuch zum Vergleich von Rat-IL-3 und Rat-1 Ko-Transplantaten wurden 6 Wochen p.t. ebenfalls LT BMC angelegt. Die Zellen dieser LT BMC wurden dann nach 14 Tagen in Kultur passagiert, d.h. nach Ablösen vom Kulturflaschenboden in eine frische Kulturflasche überführt und weitere 14 Tage kultiviert. Nach POX Färbung ergab sich ein umgekehrtes Bild, verglichen mit den nicht passagierten LT BMC. Während eine Passage von LT BMC aus Rat-IL-3 Mäusen in einer Abnahme humaner Zellen (HLA-I<sup>+</sup>) in der Kultur resultierte, kam es nach Passage von LT BMC aus Rat-1 Mäusen zu einem deutlichen Anstieg humaner Zellen in der Kultur (Abb. 32A).

Dieser Trend war ebenfalls bei den hämatopoetischen Zellen (CD45<sup>+</sup>) und den NHZ zu beobachten (Abb. 32B,C).

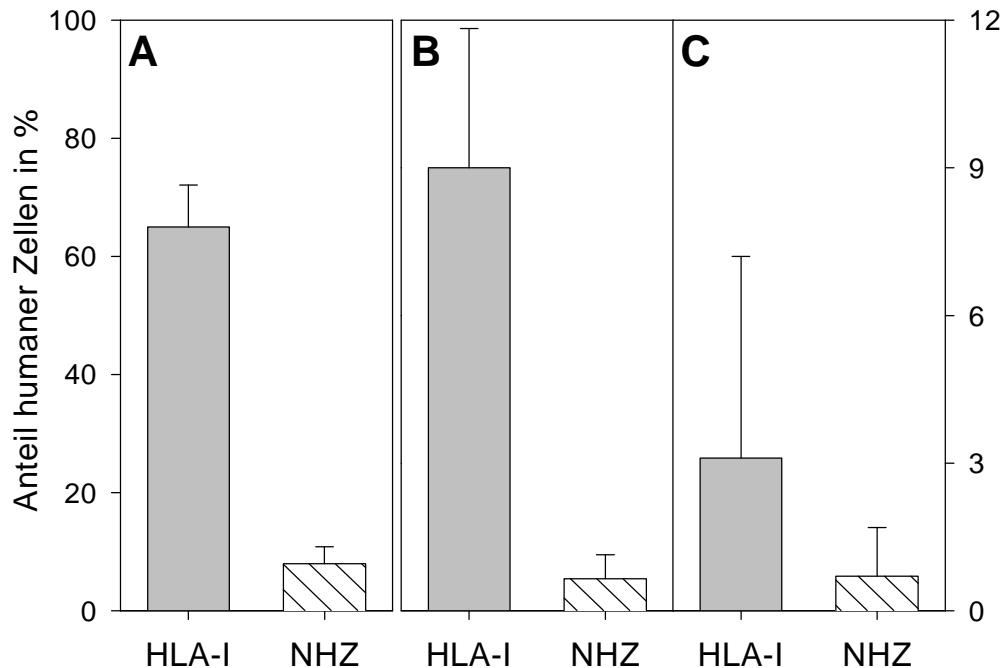


**Abbildung 32: Anteil humaner Zellen nach POX Färbung mit und ohne Passage.** NOD/SCID Mäuse wurden mit CD34<sup>+</sup> Zellen transplantiert und erhielten entweder Rat-IL-3 oder Rat-1 als Ko-Transplantat. LTBM dieser Mäuse wurden nach 14 Tagen in Kultur passagiert (P) oder regulär ohne Passage kultiviert. Abb. 32A: HLA-I, Abb. 32B: CD45; Abb. 32C: NHZ.

Offenbar sind in LTBM von Rat-1 Mäusen Vorläufer- oder Stammzellen vorhanden, welche erst durch den Stimulus der Passage in die Proliferation und Differenzierung in hämatopoetische Zellen, aber auch in NHZ, gelangen. In LTBM von Rat-IL-3 Mäusen ist dieses Potential scheinbar bereits erschöpft, so daß der Stimulus der Passage keine weitere Zellproduktion bewirken konnte.

Um diese Theorie zu bestätigen, wurde zunächst versucht, eine Sekundär-Transplantation erfolgreich durchzuführen. Dabei wird ~6 Wochen nach Transplantation der CD34<sup>+</sup> Zellen so viel Knochenmark wie möglich in eine weitere NOD/SCID Maus transplantiert (sekNOD/SCID). Kommt es in dieser sekundär transplantierten Maus erneut zur Produktion humaner Zellen, müssen die dafür erforderlichen Stamm- oder Vorläuferzellen in der primär transplantierten Maus erhalten geblieben oder sogar vermehrt worden sein. 6 NOD/SCID Mäuse wurden mit CD34<sup>+</sup> Zellen transplantiert und erhielten Rat-IL-3 als Ko-Transplantat. 7 Wochen p.t. wurde das gesamte Knochenmark aller Mäuse jeweils aus 2 Femora und

2 Tibiae gesammelt. Der Gehalt humaner CD34<sup>+</sup> Zellen wurde mit der FACS Analyse als 6,7% bestimmt. Mit jeweils  $1 \times 10^7$  dieser chimären Knochenmarkzellen pro Maus wurden 3 weitere NOD/SCID Mäuse transplantiert und LTBMK angelegt. Auch diese sekNOD/SCID Mäuse erhielten Rat-IL-3 als Ko-Transplantat. Abbildung 33 zeigt die Ergebnisse.

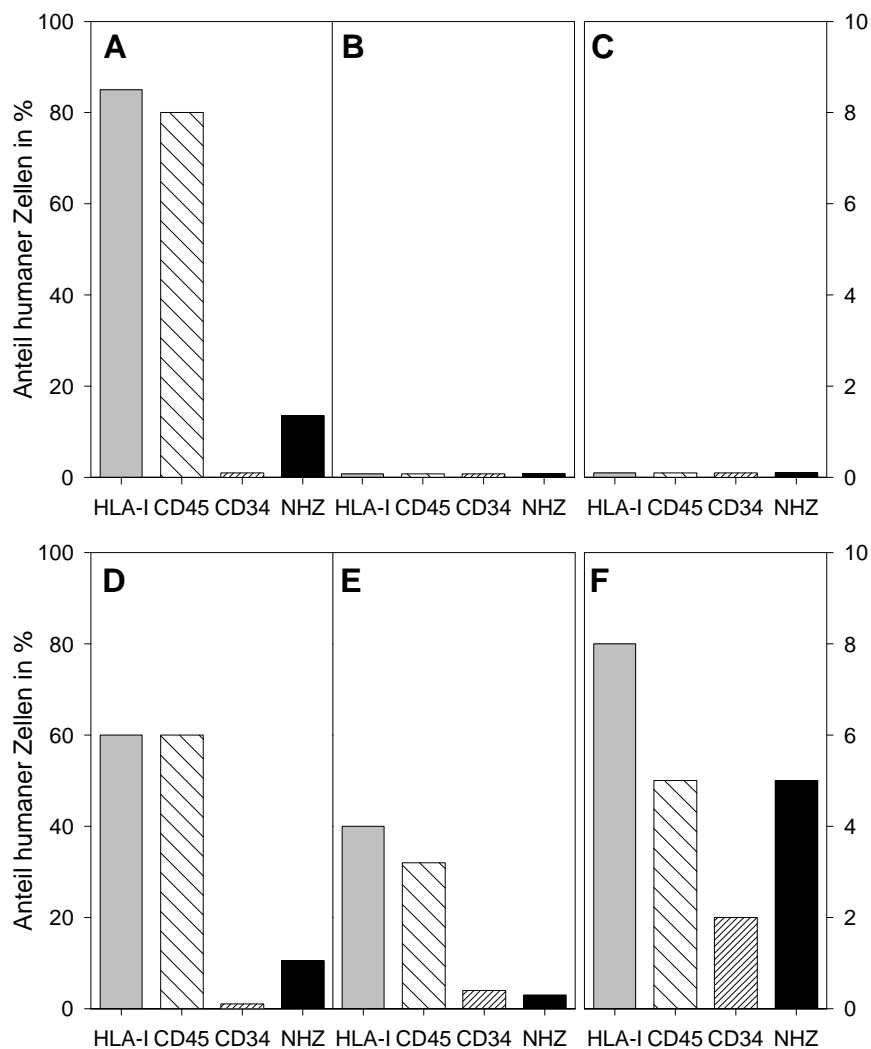


**Abbildung 33: Sekundär-Transplantation von NOD/SCID Mäusen.** Abb. 33A zeigt den Anteil humaner Zellen und NHZ nach POX Färbung im Knochenmark der primär transplantierten Mäuse (n=6). Abb. 33B zeigt die Ergebnisse der daraus angelegten LTBMK (n=3). Der Anteil humaner Zellen im Knochenmark der sekNOD/SCID ist in Abb. 33C gezeigt (n=3).

Die POX Färbung von Knochenmarkzellen der primär transplantierten Maus zeigte eine deutliche Produktion humaner Zellen (HLA-I<sup>+</sup>) und von NHZ (Abb. 33A). Auch die LTBMK zeigte nach 14 Tagen humane Zellen und NHZ in der erwarteten Größenordnung (Abb. 33B). 11 Wochen nach der Sekundär-Transplantation, also 18 Wochen nach der Primär-Transplantation, waren im Knochenmark der sekNOD/SCID Mäuse ebenfalls humane Zellen (HLA-I<sup>+</sup>) und NHZ nachweisbar (Abb. 33C). Der Anteil war mit ~3% humaner Zellen sehr gering, aber deutlich nachweisbar.

Mit der Methode der Sekundär-Transplantation wurde nun untersucht, ob sich die Theorie bestätigen lässt, hIL-3 würde Stamm- und Vorläuferzellen zur Proliferation und Differenzierung anregen. Dazu wurden 6 NOD/SCID Mäuse mit CD34<sup>+</sup> Zellen transplantiert, 3 erhielten ein Rat-IL-3 Ko-Transplantat, die anderen 3 ein Rat-1 Ko-Transplantat. Nach 7 Wochen wurden die Mäuse getötet und mit deren Knochenmark eine Sekundär-Transplantation durchgeführt. Nach weiteren 7

Wochen wurden die sekundär-transplantierten Mäuse getötet und LTBMK angelegt. Während nach der Primär-Transplantation, wie erwartet, der Anteil humaner hämatopoetischer Zellen im Knochenmark von Rat-IL-3 transplantierten Mäusen deutlich höher war als in Rat-1 Mäusen, zeigte sich nur ein geringer Unterschied in der Produktion von NHZ (Abb. 34A, D). Nach Sekundär-Transplantation von Rat-IL-3 Knochenmarkzellen waren jedoch keine humanen Zellen nachweisbar (Abb. 34B), konsequenter Weise ebenso in der daraus angelegten LTBMK (Abb. 34C). Interessanter Weise zeigte das Knochenmark der Rat-1 sekundär-transplantierten Maus dagegen einen relativ hohen Anteil humaner hämatopoetischer Zellen und von NHZ (Abb. 34E). Die aus diesem Knochenmark angelegte LTBMK enthielt einen entsprechenden Anteil humaner hämatopoetischer Zellen und NHZ (Abb. 34F).



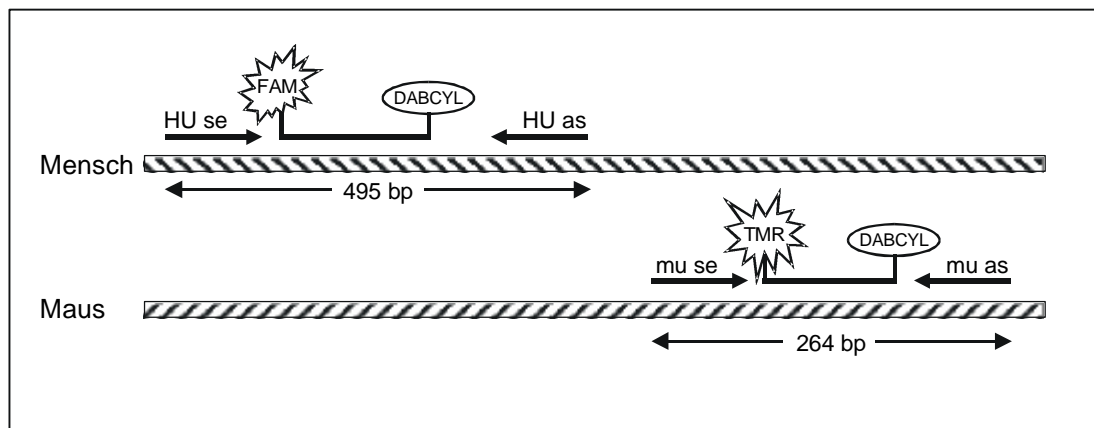
**Abbildung 34: Sekundär-Transplantation mit Rat-IL-3 und Rat-1 Ko-Transplantation.** Anteil humaner Zellen nach POX Färbung in: Knochenmark CD34<sup>+</sup> transplantiert NOD/SCID Mäuse (Abb. 34A und D), Knochenmark sekundär transplantiert Mäuse (Abb. 34 B und E, LTBMK der Mäuse aus B und E (Abb. 34 C und F). Maus A erhielt Rat-IL-3 als Ko-Transplantat, Maus D die nicht-transfizierte Zelllinie Rat-1.

Auch in dem Modell der Sekundär-Transplantation konnte also gezeigt werden, daß hIL-3 auch in NOD/SCID Mäusen humane Stamm- und Vorläuferzellen zu Proliferation und Differenzierung anregt, während diese Zellen in Abwesenheit von hIL-3 weniger proliferieren. Trotzdem scheinen sie ihr proliferatives Potential in dieser Zeit nicht zu verlieren.

Bei den in diesem Rahmen durchgeführten Versuchen wurde deutlich, daß die Reinheit der CD34<sup>+</sup> Zellen bei der Transplantation darüber entscheidet, ob eine Ko-Transplantation mit hIL-3 produzierenden Zellen erforderlich ist. Je höher die Reinheit der CD34<sup>+</sup> Zellen im Transplantat, desto wichtiger war die Gabe von hIL-3. Je höher der Anteil Cytokin-produzierender Donor-Lymphozyten im Transplantat, desto weniger ist die Cytokin Gabe notwendig.

### III.3 Quantitative Echt-Zeit PCR zum Nachweis humaner Zellen in der NOD/SCID Maus

Mit der Möglichkeit der Nutzung eines ABI Prism 7700 Thermocyclers (TaqMan), wurde eine Echt-Zeit quantitative PCR etabliert, welche das Verhältnis von humanen Zellen zu murinen Zellen in DNA Präparationen von chimären Organen bestimmt. Außerdem sollte diese Methode dazu dienen, eine Verlaufskontrolle im Blut transplantierte Mäuse zu ermöglichen.



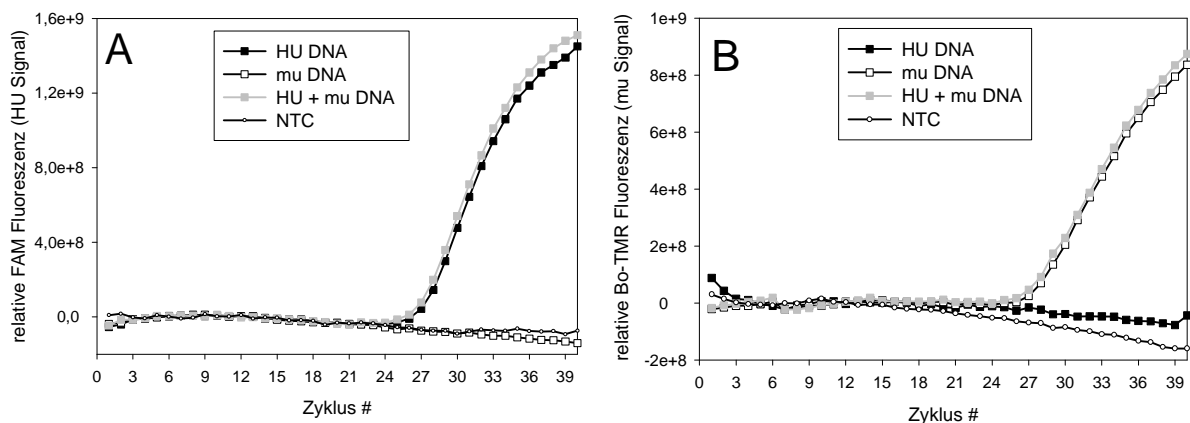
**Abbildung 35: Schematische Darstellung der Primer und Exonuklease-Proben des HUmu-Tests.** Die Primer sind jeweils in einem anderen Bereich des TNF- $\alpha$  Genlocus lokalisiert. Amplicons haben unterschiedliche Größen. Die Exonuklease-Proben sind mit unterscheidbaren Reporterfarbstoffen markiert.

Diese PCR funktioniert nach dem gleichen Prinzip, wie es für die TM-PCR zum Nachweis von HHV-6 beschrieben wurde (I.5.2.2). Ein Set aus 2 Primern und einer Exonuklease-Sonde amplifiziert spezifisch einen Bereich genomischer DNA des humanen TNF- $\alpha$  Genlocus (HU-Test), ein zweites Set aus 2 Primern und einer Exonuklease-Sonde amplifiziert spezifisch einen Bereich genomischer DNA des



murinen TNF- $\alpha$  Genlocus (mu-Test). Das TNF- $\alpha$  Gen wurde ausgewählt, weil dort die Sequenzen trotz hoher Homologie die Konstruktion spezifischer Primer und Sonden zulassen. Da die humane DNA und die murine DNA in diesem Test in einer Duplex-Reaktion simultan nachgewiesen werden sollten, mußten die Exonuklease-Sonden mit verschiedenen, unterscheidbaren Reporterfarbstoffen markiert werden. Als Reporterfarbstoffe wurden deshalb FAM für den HU-Test und Bo-TMR für den mu-Test verwendet. Als Quencher-Farbstoff diente in beiden Tests DABCYL. Abbildung 35 zeigt schematisch die Lokalisation aller verwendeten Primer und Exonuklease-Sonden des HUmu-Tests.

Als Positivkontrollen diente DNA präpariert aus humanen Knochenmarkzellen bzw. murinen Knochenmarkzellen. Zuerst wurden damit die optimalen Reaktionsbedingungen für die einzelnen Tests, HU-Test und mu-Test, ermittelt. Dabei wurde von Beginn an versucht, für beide Tests identische Bedingungen zu verwenden. Es zeigte sich, daß der HU-Test spezifisch humane DNA amplifiziert, die gleiche Menge muriner DNA führte zu keiner Signalbildung (Abb.36A). Darüber hinaus war die Amplifikation humaner DNA nicht beeinträchtigt durch die gleichzeitige Anwesenheit identischer Mengen muriner DNA, was sich in nahezu identischen  $C_T$ -Wert und Kurvenverläufen dokumentierte. Diese Ergebnisse konnten auch für den mu-Test bestätigt werden (Abb. 36B). Der mu-Test amplifiziert ausschließlich murine DNA, in seiner Sensitivität unabhängig davon, ob humane DNA anwesend ist.

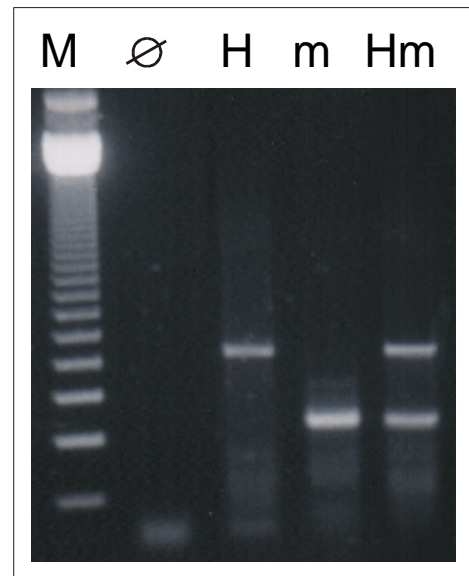


**Abbildung 36: Amplifikationskurven der einzelnen Tests zur Quantifizierung humaner und muriner Zellen.** Abb. 36A: HU-Test: Humane DNA wird spezifisch amplifiziert, ohne Verlust in der Sensitivität durch die gleichzeitige Anwesenheit von muriner DNA. Murine DNA wird nicht amplifiziert. Abb. 36B: mu-Test: Murine DNA wird unbeeinflusst von humaner DNA amplifiziert. Humane DNA gibt kein Signal mit dem mu-Test.

Nachdem die Spezifität der beiden Tests gewährleistet war, wurden HU-Test und mu-Test unter den gleichen Bedingungen wie für die einzelnen Tests zusammen in einem Reaktionsgefäß durchgeführt. Abbildung 37 zeigt die gelelektrophoretische

Auftrennung der PCR Produkte. Beim Einsatz von humaner DNA bzw. muriner DNA erhielt man eine diskrete Bande entsprechend der eingesetzten DNA in der erwarteten Größe: 495 bp für humane DNA und 264 bp für murine DNA. Wurden humane und murine DNA im Verhältnis 1:1 gemischt und als Matrize in die PCR eingesetzt, so erhielt man beide Banden gleichzeitig.

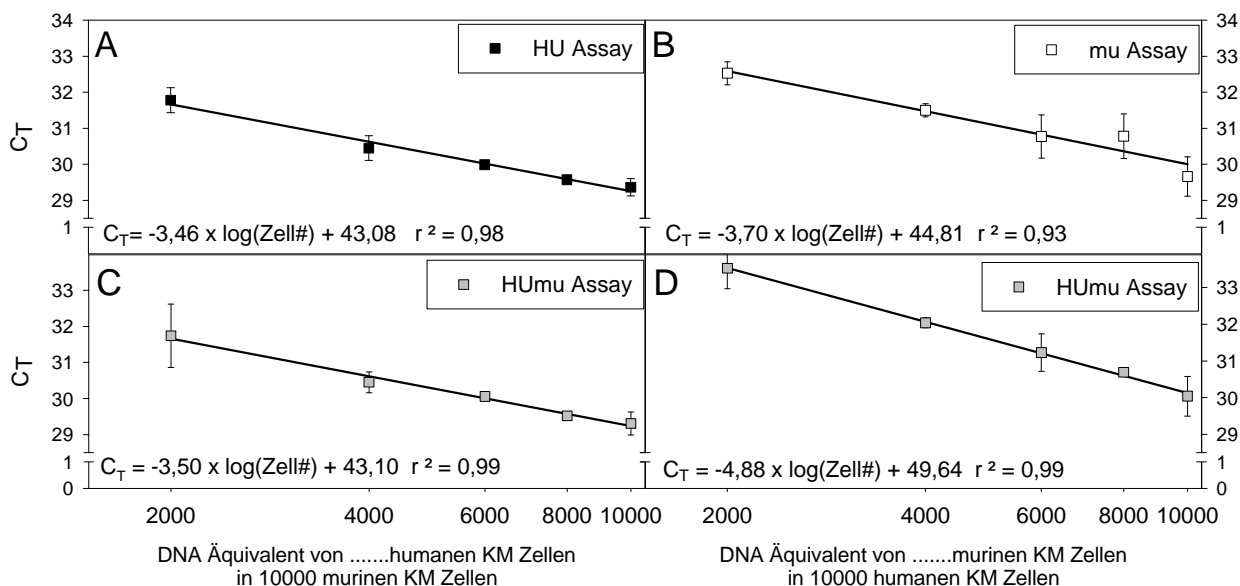
Da dieser PCR Test genutzt werden sollte, um das Verhältnis humaner Zellen zu murinen Zellen zu bestimmen, mußte eine Kalibrierung erfolgen. Im Gegensatz zur herkömmlichen Strategie der Kalibrierung mit Hilfe definierter



**Abbildung 37: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR Produkte des HUmu-Tests.** M: 123 bp Leiter, Ø: Negativkontrolle, H: humane DNA, m: murine DNA, Hm: Humane und murine DNA

Mengen entsprechender Plasmide, erschien es hier sinnvoller, bei der Kalibrierung von einer definierten Zellzahl auszugehen. Wie bei der Analyse von chimärem Knochenmark oder Blut geht dadurch die Extraktion der DNA, mit dem damit verbundenen DNA Verlust in die Kalibrierungsprozedur mit ein. Für die Standardgeraden wurden zuerst Verdünnungsreihen von  $10^7$ - $10^2$  humanen Knochenmarkzellen angefertigt, aus diesen Zellen die DNA extrahiert und 1/10 der DNA-Lösung in den HU-Test eingesetzt. Diese eingesetzte DNA Menge entsprach dementsprechend einer Verdünnungsreihe von  $10^6$ - $10^1$  Zellen. Mit murinen Knochenmarkzellen wurde analog verfahren. Für beide Tests erhielt man eine lineare Abhängigkeit zwischen der eingesetzten Menge von Zellen und dem  $C_T$ -Wert von  $10^6$ - $10^2$  Zellen. Da bei der Untersuchung von chimärem Blut jedoch selten solch hohe Zellzahlen erreicht werden, wurde der HUmu-Test an die für die Praxis relevante Größenordnung angepaßt. Davon ausgehend, daß einer Maus wöchentlich 50  $\mu$ L Blut abgenommen werden können ohne dadurch gesundheitliche Komplikationen hervorzurufen und daß darin durchschnittlich  $10^5$  Zellen enthalten sind, wurden  $10^5$  Zellen als Richtwert für die DNA Extraktion verwendet. Einem konstanten Hintergrund von  $10^5$  murinen Knochenmarkzellen wurden  $2 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^4$  und  $1 \times 10^5$  humane Knochenmarkzellen zugemischt. Aus diesen Gemischen wurde die DNA extrahiert und 1/10 der DNA-Lösung mit dem HUmu-Test gemessen. Um den Einfluß der Duplex-Reaktion zu ermitteln, wurden die gleichen Proben auch mit dem HU-Test allein gemessen. Vollkommen analog wurde eine vergleichbare Verdünnungsreihe von murinen Knochenmarkzellen in einem konstanten Hintergrund humaner Knochenmarkzellen angefertigt. Diese Proben

wurden mit dem HUmu-Test und dem mu-Test gemessen. In Abbildung 38 sind die resultierenden Standardgeraden gezeigt. Sie sind aus vier unabhängigen Versuchen, beginnend mit der Zellzählung, gemittelt.



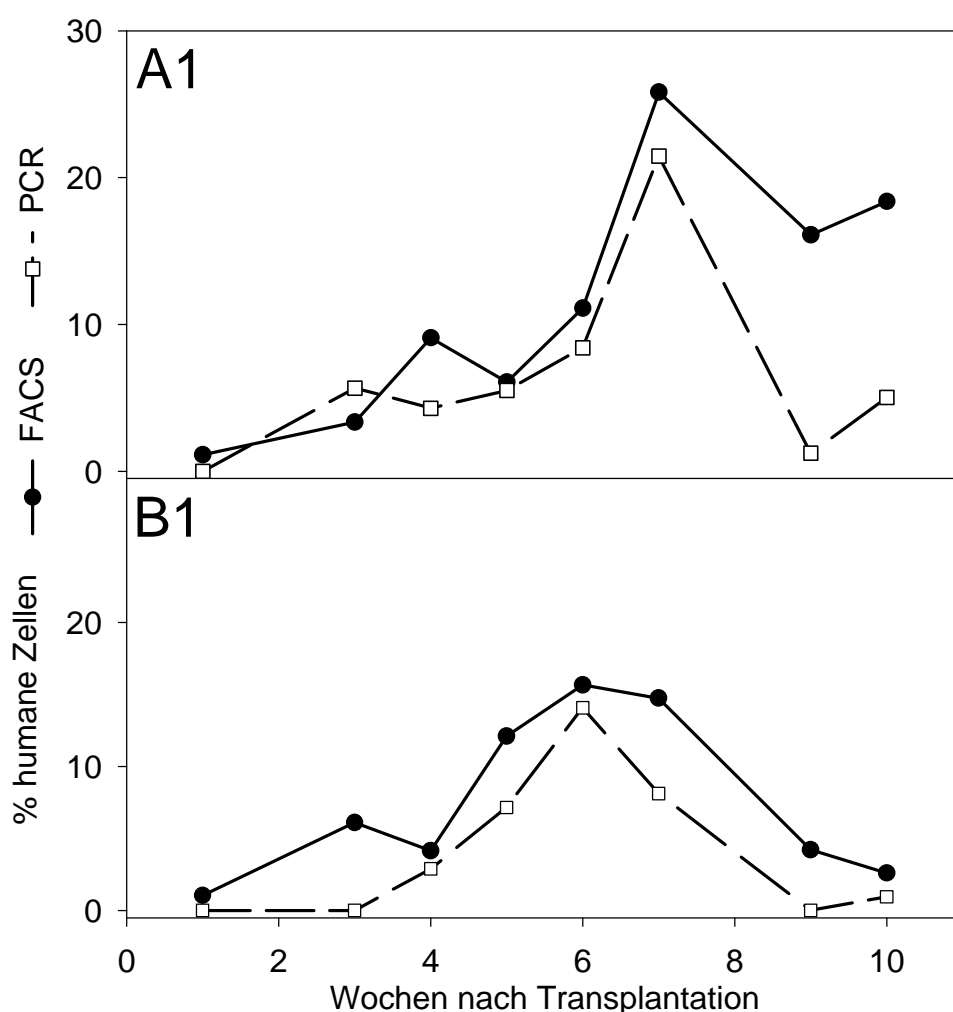
**Abbildung 38: Standardgeraden für die Quantifizierung humaner und muriner Zellen.**

Abb. 38A: 2,000-10,000 humane Zellen wurden in 10,000 murinen Zellen verdünnt, daraus DNA extrahiert und mit dem HU-Assay gemessen. In Abb. 38C wurden die gleichen DNA Proben mit dem HUmu-Test gemessen. Abb. 38B: Umgekehrte Verdünnung von murinen Zellen in humanen Zellen gemessen mit dem mu-Test und mit dem HUmu-Test (Abb. 38D). Es wurden jeweils 4-fach Proben in 4 unabhängigen Experimenten gemessen.

Sowohl mit dem HU-Test allein, als auch mit dem HUmu-Test, konnte eine lineare Korrelation zwischen eingesetzter Menge humaner Zellen und  $C_T$ -Wert erhalten werden (Abb. 38A und C). Dabei wiesen die Standardgeraden nahezu identische Charakteristika auf, auch die Regressionskoeffizienten waren mit  $r^2 > 0,98$  sehr gut. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine deutliche Veränderung der Standardgeraden wenn der mu-Test allein mit dem HUmu-Test verglichen wurden (Abb. 38B und D). Obwohl die Korrelation für den HUmu-Test mit  $r^2 = 0,99$  besser war als für den mu-Test allein ( $r^2 = 0,93$ ), zeigte die Standardgerade des HUmu-Tests ein steileres Gefälle. Dies bedeutet, daß die gleiche Menge muriner DNA später detektiert wird als bei Messung mit dem mu-Test. Trotzdem war der HUmu-Test sensitiv genug, um ein DNA Aliquot von 2000 murinen Zellen zu detektieren. Die Variabilität für den Duplex-HUmu-Test beträgt 15% für den Nachweis humaner DNA und 20% für den Nachweis muriner DNA.

Um Unterschiede bei der Messung unterschiedlicher Zelltypen abschätzen zu können, wurden diese Versuche mit humanen CB-MNC, humanen Gesamt-Leukozyten, HSB-2 Zellen und den murinen Zelllinien CMT93 und B16-FO wiederholt. Dabei kam es nur zu geringen Unterschieden bezüglich der Steigung und Korrelationen der Standardgeraden.

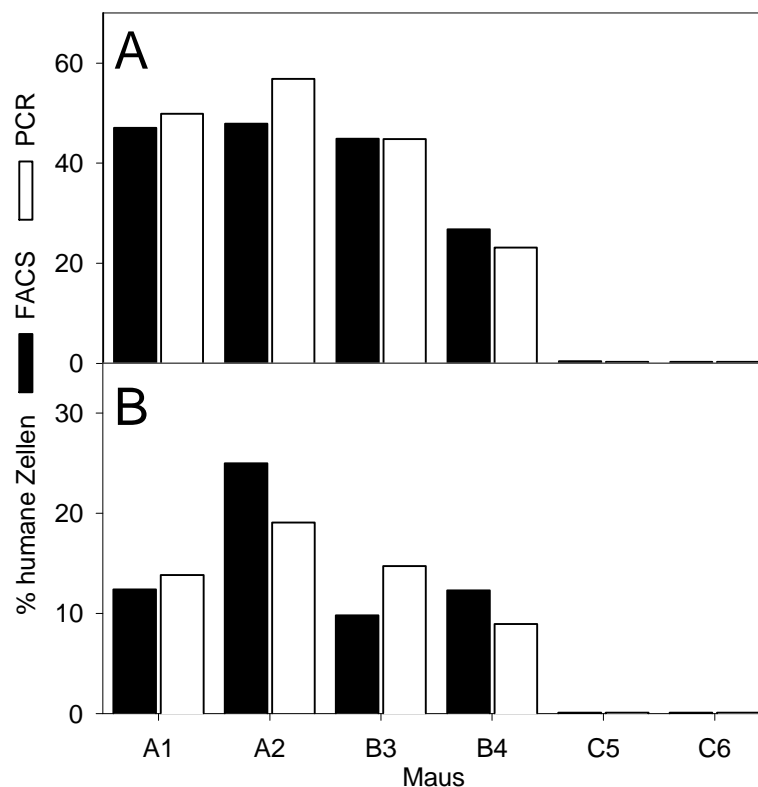
Nachdem gezeigt worden war, daß der HUmU-Test zur Quantifizierung von humanen und murinen Zellen mit hoher Genauigkeit geeignet ist, wurden 4 NOD/SCID Mäuse mit  $CD34^+$  Zellen transplantiert und der Anteil humaner Zellen im Blut dieser Mäuse im Verlauf gemessen. Dazu wurden den Mäusen alle 2 Wochen 100  $\mu$ L Blut entnommen, aus 50  $\mu$ L wurde DNA extrahiert und die verbleibenden 50  $\mu$ L wurde für die FACS Analyse verwendet, in der HLA-I und  $CD45^+$  Zellen quantifiziert wurden. Mit dem HUmU-Test wurde die Anzahl humaner Zellen und die Anzahl muriner Zellen bestimmt und daraus der Anteil humaner Zellen berechnet. Abbildung 39 zeigt den Anteil humaner Zellen im Verlauf, verglichen mit den Ergebnissen der FACS Analyse, für 2 chimäre NOD/SCID Mäuse.



**Abbildung 39: Messung des Anteils humaner Zellen im Blut in den ersten 10 Wochen nach Transplantation von  $CD34^+$  Zellen.** Verglichen sind die Ergebnisse nach FACS Quantifizierung mit denen des HUmU-Tests. Maus B1 ist die doppelte Menge  $CD34^+$  Zellen transplantiert worden.

Maus A1 in Abbildung 39 wurde mit  $2,5 \times 10^5$   $CD34^+$  Zellen, Maus B1 in Abbildung 39 mit  $5 \times 10^5$   $CD34^+$  Zellen transplantiert. Es wird deutlich, daß die Ergebnisse des HUmU-Tests sich gut mit den Ergebnissen der FACS Analyse

decken. Beide Methoden detektieren den maximalen Anteil humaner Zellen zum gleichen Zeitpunkt, 7 bzw. 6 Wochen nach Transplantation. Die maximalen Anteile humaner Zellen betragen für 25,8% bzw. 15,7% nach FACS Analyse und 21,5% bzw. 14,1% nach Berechnung aus den Ergebnissen des HUmu-Tests. In Maus A1, welche mit der halben Anzahl CD34<sup>+</sup> Zellen transplantiert worden ist, scheint der Anteil humaner Zellen im Blut langsamer anzusteigen als in Maus B1, bei der die doppelte Anzahl CD34<sup>+</sup> Zellen verwendet wurde. Nach 10 Wochen wurden die Mäuse getötet und der Anteil humaner Zellen im Knochenmark und in der Milz mit dem HUmu-Test und mittels FACS Analyse bestimmt. Auch hier war eine gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der beiden unterschiedlichen Nachweismethoden festzustellen. Abbildung 40 zeigt die Anteile humaner Zellen in Knochenmark (Abb. 40A) und Milz (Abb. 40B) der 4 transplantierten NOD/SCID Mäuse und der 2 Kontrollmäuse ohne Transplantation.



**Abbildung 40: Vergleich von FACS Analyse und HUmu-Test in Organen.** 10 Wochen nach Transplantation von CD34<sup>+</sup> Zellen wurden Knochenmark (Abb. 40A) und Milz (Abb. 40B) der NOD/SCID Mäuse mit beiden Methoden analysiert.

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

Um den Einfluß von HHV-6 auf die Bildung humaner hämatopoetischer Zellen und humaner NHZ in der NOD/SCID Maus zu ermitteln, wurden unterschiedliche Xenotransplantate, CB-MNC und CB-CD34<sup>+</sup> Zellen, sowie unterschiedliche Zeitpunkte der Infektion untersucht (Tab. 32).

**Tabelle 32: Experimente zur Ermittlung des Einflusses von HHV-6 auf die Chimären-Hämatopoese**

Xenotransplantat	Infektion mit	Untersuchter Parameter	Methode
CB-MNC	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HHV-6A oder HHV-6B</li> <li>• vor Transplantation</li> </ul>	<i>Anteil und Art humaner hämatopoetischer und nicht-hämatopoetischer Zellen in</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>KM, Blut und Milz</i></li> <li>• <i>LTBMC</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• FACS</li> <li>• Immuncytochemie</li> <li>• PCR</li> </ul>
		<i>Nachweis von HHV-6</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>DNA</i></li> <li>• <i>RNA</i></li> <li>• <i>Antigen</i></li> </ul>	
CD34 <sup>+</sup> Zellen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• nach Transplantation</li> <li>• 12 Tage</li> <li>• 3 Tage</li> </ul>	<i>Nachweis von HHV-6</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>DNA</i></li> <li>• <i>RNA</i></li> <li>• <i>Antigen</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TM-PCR</li> <li>• IFA</li> </ul>

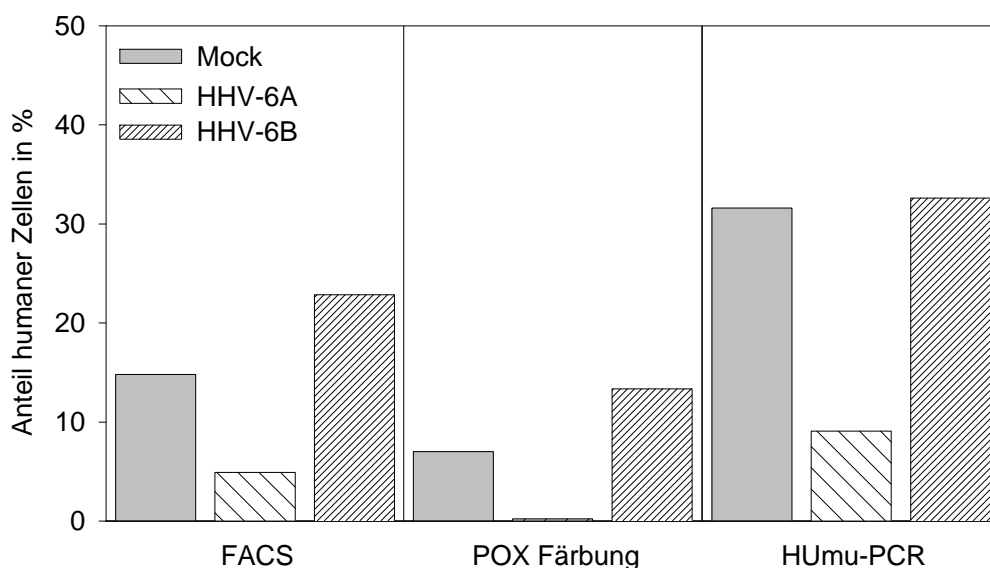
### IV.1 Transplantation von CB-MNC nach Inkubation mit HHV-6

CB-MNC wurden aus CB isoliert und für 2-4 h unmittelbar vor der Transplantation mit zellfreien, virushaltigen Zellkultur-Überständen inkubiert. Als Kontrolle wurde eine Mock-Infektion durchgeführt (C.II.1). Die gleichen Zellkultur-Überstände wurden zum Nachweis der Infektiosität für eine Kontrollinfektion verwendet (C.II).

Um die Vergleichbarkeit zur Transplantation von CD34<sup>+</sup> Zellen zu gewährleisten, wurden in allen Versuchen routinemäßig Rat-IL-3 Zellen ko-transplantiert.

Nach 6 Wochen wurde das Engraftment humaner Zellen in Knochenmark, Blut und Milz der Maus mit der FACS Analyse bestimmt. Es zeigte sich, daß die Bildung humaner Zellen nach Infektion mit HHV-6A deutlich reduziert war. Im Gegensatz dazu, zeigten Mäuse nach Mock-Infektion und nach Infektion mit HHV-6B einen vergleichbar hohen und, für diesen Zeitraum nach Transplantation erwarteten, Anteil humaner Zellen. Abbildung 41 zeigt die Ergebnisse für Knochenmark nach FACS Analyse, POX Färbung und dem Humu-Test. Alle Methoden liefern vergleichbare Ergebnisse.

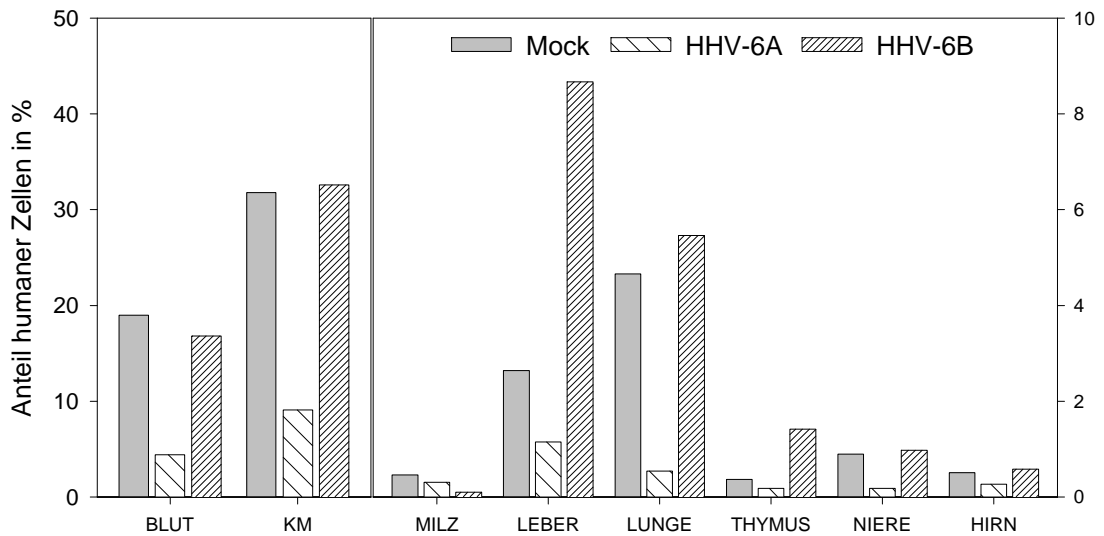
Die Ausbildung einer Multilinen-Hämatopoese, d.h. die Differenzierung von Zellen bestimmter Subpopulationen, z.B. CD10<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> oder CD38<sup>+</sup> Zellen, war, gemessen an der Gesamtzahl humaner Zellen (HLA-I<sup>+</sup>), in allen Mäusen jeweils vergleichbar. CD34 als Marker potentieller PHSZ war in geringen Mengen auch in Mäusen nach HHV-6A Infektion nachweisbar. In diesen Mäusen war der Anteil humaner Zellen insgesamt jedoch so gering, daß deshalb nicht alle Marker bestimmter Subpopulationen nachgewiesen werden konnten. Mit Hilfe der POX Färbung konnte gezeigt werden, daß auch der Anteil von NHZ, gemessen am Anteil humaner Zellen, in allen Mäusen vergleichbar war.



**Abbildung 41: CB-MNC initiierte Bildung humaner Zellen im Knochenmark der NOD/SCID Maus nach Infektion mit HHV-6.** Alle drei Nachweismethoden zeigen nach Infektion mit HHV-6A einen deutlich geringeren Anteil humaner Zellen im Knochenmark der NOD/SCID Maus. Gezeigt ist der Mittelwert aus jeweils 2 Mäusen.

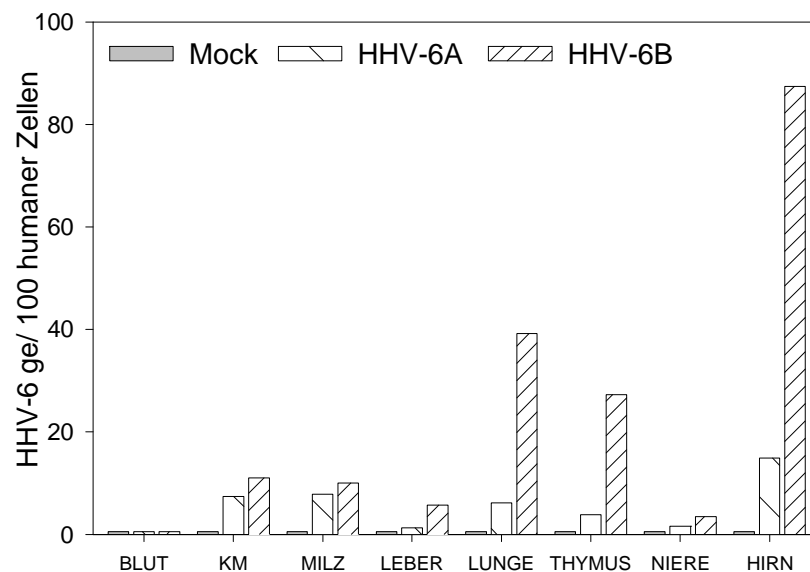
Die aus dem Knochenmark aller Mäuse angelegten LTBMCS zeigten ebenfalls einen vergleichbaren Anteil humaner Zellen nach Mock- und HHV-6B Infektion, während in LTBMCS aus Mäusen nach HHV-6A Infektion keine humanen Zellen identifiziert werden konnten (Mock: 3,4% HLA-I<sup>+</sup>, HHV-6B: 4,5% HLA-I<sup>+</sup>). Eine Veränderung der Morphologie in LTBMCS nach HHV-6B Infektion war nicht zu beobachten.

Mit dem HUMu-Test konnte der Anteil humaner Zellen in den verschiedenen Organen der Maus untersucht werden. Der Anteil humaner Zellen war im Knochenmark am größten, in soliden Organen wie Milz, Niere und Hirn nur sehr gering (<2%). Weiterhin wurde deutlich, daß in allen untersuchten Organen, mit Ausnahme der Milz, der Anteil humaner Zellen nach Mock- und HHV-6B Infektion vergleichbar, nach HHV-6A Infektion jedoch stark reduziert war. Abbildung 42 zeigt den Anteil humaner Zellen in allen untersuchten Organen.



**Abbildung 42: CB-MNC initiierte Bildung humaner Zellen in verschiedenen Organen der NOD/SCID Maus nach Infektion mit HHV-6.** Der Anteil humaner Zellen wurde mit der Humu-PCR bestimmt. Gezeigt ist der Mittelwert aus zwei Mäusen.

DNA aus allen Organen wurde ebenfalls mit der TM-PCR zum Nachweis von HHV-6 DNA untersucht. Dabei wurde die DNA aus allen Mäusen, nach Mock-, HHV-6A und HHV-6B Infektion, in beide TM-PCR Tests zum Nachweis von HHV-6A und HHV-6B DNA eingesetzt. Die Viruslast wurde auf 100 humane Zellen in dem jeweiligen Organ bezogen. In Mäusen nach Mock-Infektion konnte keine HHV-6 DNA nachgewiesen werden. In Mäusen nach HHV-6 Infektion war außer in Blut in allen untersuchten Organen HHV-6 DNA der zur Infektion verwendeten Variante nachweisbar. Die Viruslast war für HHV-6B jeweils höher, als für HHV-6A und am größten in Hirn und Lunge für HHV-6B, in Hirn und KM für HHV-6A.



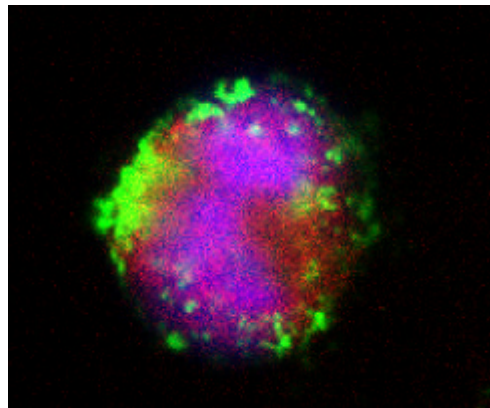
**Abbildung 43: Viruslast in Organen von NOD/SCID Mäusen nach Transplantation infizierter CB-MNC.** Die Viruslast wurde mit der TM-PCR ermittelt und auf 100 humane Zellen bezogen. DNA einer Mock-infizierten Maus führt zu keiner Signalbildung, d.h. murine DNA wird mit der TM-PCR nicht amplifiziert.



Aus dem Knochenmark dieser Mäuse wurde zusätzlich RNA extrahiert und daraus cDNA synthetisiert, um diese mit der TM-PCR nach HHV-6 spezifischer cDNA zu untersuchen. Für beide Varianten A und B konnte ein Signal erhalten werden, welches jedoch für HHV-6B sehr schwach war.

Schließlich wurde versucht, mit dem IFA in Einzelzell-Suspensionen des Knochenmarks HHV-6 Antigen nachzuweisen. In einer Doppelfärbung wurden

gleichzeitig mit dem HHV-6 spezifischen mAb H-AR-2bio Antikörper gegen humanes HLA-I, humanes CD45 und humanes CD34 eingesetzt. Während HLA-I und CD45 positive Zellen nachgewiesen werden konnten, war der Nachweis CD34 positiver Zellen in diesem Versuch nicht möglich. HHV-6 positive Zellen waren im Knochenmark von Mäusen nach HHV-6B Infektion in sehr geringer Anzahl (<1%) nachweisbar, wobei das HHV-6 Signal in den gleichen Zellen wie das CD45 Signal detektiert werden konnte. Abbildung 44



**Abbildung 44: Doppelfärbung von chimären Knochenmarkzellen nach Infektion mit HHV-6.** HHV-6 mAb H-AR-2bio (rot) und CD45 mAb (grün). Kernfärbung mit DAPI (blau).

zeigt die cLSM Aufnahme einer HHV-6 und CD45 positiven Zelle.

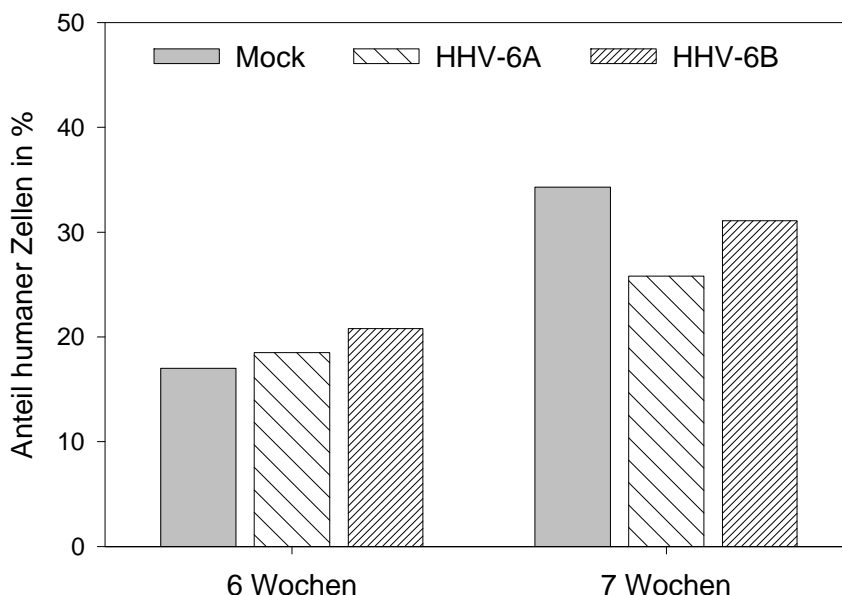
Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß nach Inkubation mit HHV-6A die CB-MNC initiierte Bildung humaner Zellen in der NOD/SCID Maus reduziert ist. Sie beschränkt sich nicht auf bestimmte Zellreihen und betrifft ebenso die nicht-hämatopoetischen Zellen. Obwohl HHV-6B DNA und RNA ebenso wie HHV-6A DNA in verschiedenen Organen nachweisbar ist, scheint HHV-6B keinen Einfluß auszuüben.

#### **IV.2 Transplantation von CB-CD34<sup>+</sup> Zellen nach Inkubation mit HHV-6**

Vergleichend zur Transplantation von CB-MNC wurden CD34<sup>+</sup> Zellen aus CB isoliert und unmittelbar vor der Transplantation 2-4 h mit HHV-6-haltigen Kulturüberständen inkubiert. Auch hier wurde eine Mock-Infektion und eine Kontrollinfektion durchgeführt (C.II). In diesen Versuchen wurden routinemäßig Rat-IL-3 Zellen ko-transplantiert.

In zwei unabhängigen Versuchen konnte weder in Knochenmark, Blut oder Milz eine reduzierte Bildung humaner Zellen nach Inkubation mit HHV-6A oder HHV-6B festgestellt werden. Die FACS Analyse des Knochenmarks der Mäuse nach HHV-6 Infektion zeigte 6 und 7 Wochen p.t. einen vergleichbaren Anteil an HLA-I<sup>+</sup> Zellen,

wie in Mäusen nach Mock-Infektion (Abb. 45). Der etwas geringere Anteil humaner Zellen in Mäusen nach HHV-6A Infektion 7 Wochen p.t. konnte mit der POX Färbung und dem Humu-Test nicht bestätigt werden; mit diesen Methoden wurde



**Abbildung 45: CD34<sup>+</sup> Zell initiierte Bildung humaner Zellen im Knochenmark der NOD/SCID Maus nach Infektion mit HHV-6.** Weder 6 noch 7 Wochen p.t. treten nach FACS Analyse deutliche Unterschiede nach Inkubation mit HHV-6 auf. Gezeigt ist der Mittelwert aus jeweils 2 Mäusen.

eher ein leicht erhöhter Anteil humaner Zellen nach HHV-6A Infektion gemessen.

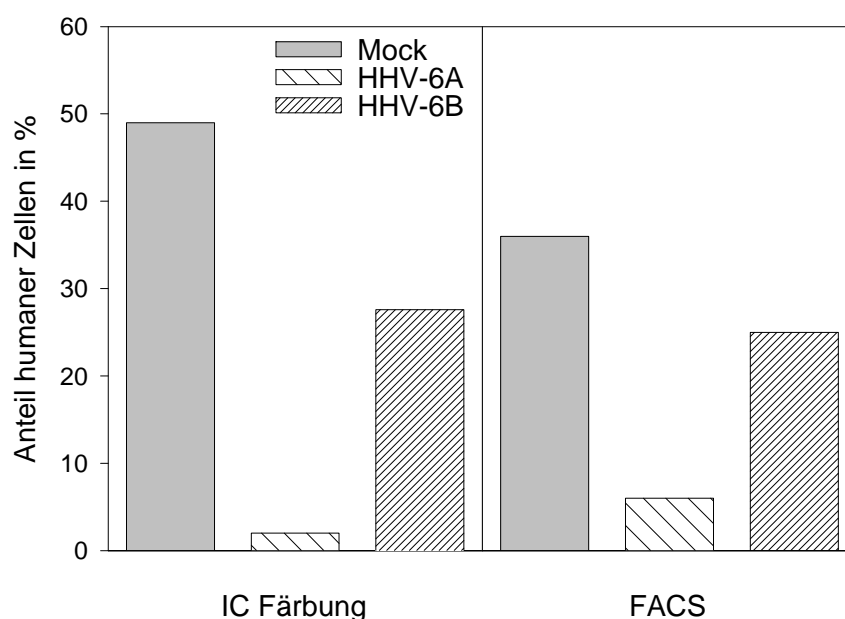
Die Multilinen-Hämatopoese, einschließlich des Anteils an CD34<sup>+</sup> Zellen, war nicht verändert. Keine der untersuchten Zellreihen wurde unverhältnismäßig stark oder schwach ausgebildet. Die POX Färbung zeigte, daß auch nicht-hämatopoetische Zellen in vergleichbaren Anteilen gebildet wurden. So betrug der Anteil an NHZ im Knochenmark nach Mock-Infektion 21,5%, nach HHV-6A Infektion 20,5% und nach HHV-6B Infektion 19%. LTBMK konnten in diesem Versuch nicht angelegt werden, zeigten jedoch in einem weiteren Versuch keine Unterschiede bezüglich des Anteils humaner Zellen. Mit der PCR waren im Knochenmark weder HHV-6 DNA noch HHV-6 RNA nachweisbar.

Offensichtlich hatte die Inkubation der CD34<sup>+</sup> Zellen vor der Transplantation keinen Einfluß auf die Bildung humaner Zellen. Dieser Unterschied zur Transplantation von HHV-6 infizierten CB-MNC deutete darauf hin, daß die transplantierte Population der angereicherten CD34<sup>+</sup> Zellen nicht infizierbar ist oder zumindest nicht auf die Anwesenheit von HHV-6 reagiert.

Deshalb wurde in einem weiteren Versuch die Infektion erst 12 Tage nach der Transplantation der CD34<sup>+</sup> Zellen durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt sollten die PHSZ bereits im Knochenmark eingewandert sein und die Bildung humaner Zellen

begonnen haben. Die Infektion erfolgte in diesem Versuch durch Injektion HHV-6-haltiger Kulturüberstände.

Nach weiteren 4 bzw. 5 Wochen, d.h. 6 und 7 Wochen p.t., wurden die Mäuse untersucht. POX Färbung und FACS Analyse des Knochenmarks zeigten, daß es nun zu einem deutlich verminderten Anteil humaner Zellen nach HHV-6A Infektion kam, verglichen mit der Mock-Infektion. Auch nach HHV-6B Infektion war der Anteil humaner Zellen geringer, jedoch nicht in dem Ausmaß wie nach HHV-6A Infektion (Abb. 46).

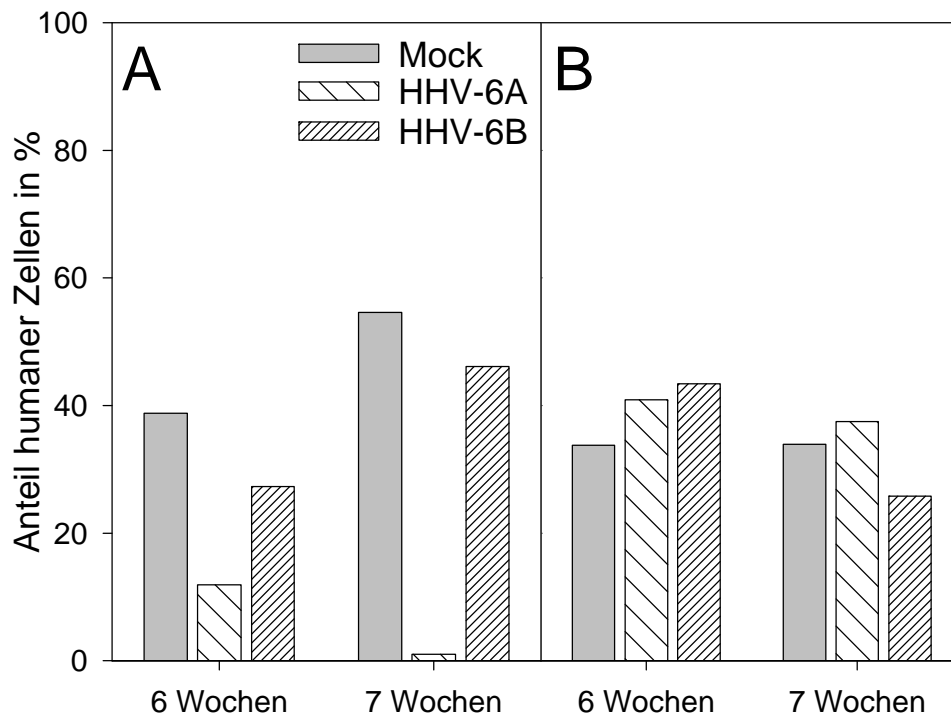


**Abbildung 46: CD34<sup>+</sup> Zell initiierte Bildung humaner Zellen im Knochenmark der NOD/SCID Maus nach Infektion mit HHV-6 12 Tage p.t..** Die Bildung humaner Zellen ist stark reduziert nach Infektion von HHV-6A. Gezeigt sind die Mittelwerte aus jeweils 2 Mäusen.

Die Multilinen-Hämatopoese war unverändert, der Anteil bestimmter Zellreihen im Verhältnis zu den HLA-I<sup>+</sup> Zellen war in allen Mäusen vergleichbar, auch der der CD34<sup>+</sup> Zellen. Der Anteil nicht-hämatopoetischer Zellen war im Knochenmark von Mäusen nach Mock-Infektion in diesem Versuch um ~50% größer als in Mäusen nach HHV-6B Infektion, was auf einen unverhältnismäßig hohen Anteil EN-4 positiver Zellen (12%) in einer der Mock-infizierten Mäuse zurückzuführen ist. Im Knochenmark der Mäuse konnte mit der TM-PCR HHV-6 DNA in einer Konzentration von 6 ge/100 humane Zellen nach HHV-6A Infektion und von 13 ge/in Mäusen nach HHV-6B Infektion nachgewiesen werden. Auch in anderen Organen war HHV-6 DNA in der gleichen Größenordnung nachweisbar. Im Gegensatz zu HHV-6A RNA war HHV-6B RNA im Knochenmark nicht zu detektieren.

Dieser Versuch zeigte einen inhibierenden Effekt von HHV-6A auf die Bildung humaner Zellen auch bei Transplantation von CD34<sup>+</sup> Zellen, wobei die Infektion aber erst erfolgte, nachdem die PHSZ im Knochenmark eingestiegen waren und die Bildung humaner Zellen begonnen hatte.

In einem weiteren Versuch wurden daraufhin CB-MNC und CD34<sup>+</sup> Zellen des gleichen Nabelschnurbluts transplantiert. Die Injektion HHV-6-haltiger Kulturüberstände erfolgte drei Tage nach der Transplantation. Nach 6 und 7 Wochen wurden die Mäuse untersucht. Abbildung 48 zeigt den Anteil humaner Zellen für CB-MNC (Abb. 47A) und CD34<sup>+</sup> transplantierte Mäuse (Abb. 47B).



**Abbildung 47: Vergleich des Einflusses von HHV-6 auf CB-MNC und CD34<sup>+</sup> transplantierte NOD/SCID Mäuse bei Infektion 3 Tage p.t..** Anteil humaner Zellen im Knochenmark nach FACS Analyse. Abb. 47A: CB-MNC Transplantation, Abb. 47B: CD34<sup>+</sup> Transplantation.

Sechs Wochen nach Transplantation von CB-MNC war die Bildung humaner Zellen nach HHV-6A Infektion deutlich und nach HHV-6B Infektion nur gering reduziert. Dieser Unterschied wurde bei der HHV-6A Infektion nach 7 Wochen noch deutlicher. Wurden die gleichen virushaltigen Kulturüberstände in NOD/SCID Mäuse injiziert, die mit CD34<sup>+</sup> Zellen transplantiert worden waren, zeigte sich nach 6 und 7 Wochen eine wenig erhöhte Bildung humaner Zellen. Lediglich 7 Wochen p.t. war der Anteil humaner Zellen nach HHV-6B Infektion um 20% geringer, als in der Maus nach Mock-Infektion. Bei diesen geringen Unterschieden, wie sie in diesem Fall zwischen Mock- und HHV-6B Infektion auftraten, kann die Individualität der Mäuse eine große Rolle spielen.

Die Multilinien-Hämatopoese war erneut unbeeinflusst durch die HHV-6 Infektion. Weder nach CB-MNC noch nach CD34<sup>+</sup> Transplantation konnten Unterschiede bei der Bildung der verschiedenen Blutzellreihen bemerkt werden. Der Anteil CD34<sup>+</sup> Zellen im Knochenmark war nach HHV-6A Infektion proportional zum Gesamtanteil humaner Zellen reduziert, nach HHV-6B Infektion traten keine Unterschiede auf. Da in diesem Versuch die Bildung nicht-hämatopoetischer Zellen im Knochenmark nur sehr gering war (~2%), konnten keine Unterschiede bezüglich der Bildung dieser Zellen festgestellt werden.

HHV-6 DNA war in Knochenmark, Thymus und Milz HHV-6 infizierter Mäuse nach CB-MNC Transplantation nachweisbar. Dabei war die Viruslast für HHV-6B höher als für HHV-6A. In Mäusen nach CD34<sup>+</sup> Transplantation konnte keine HHV-6 DNA detektiert werden. Tabelle 33 faßt die Ergebnisse zusammen. HHV-6 RNA war nur im Knochenmark und der Thymus einer CB-MNC transplantierten Maus nachweisbar.

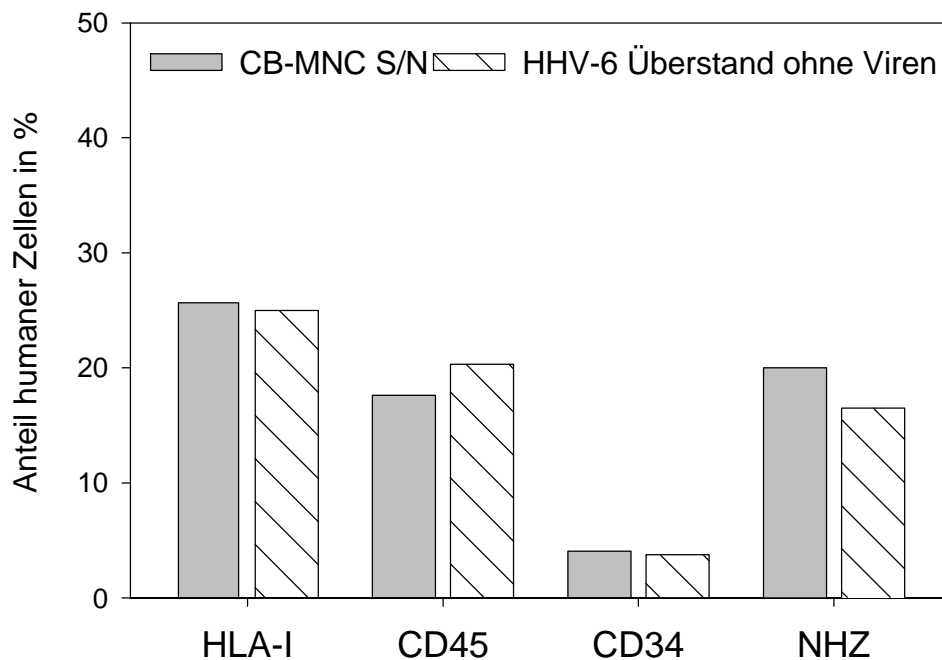
**Tabelle 33: HHV-6 DNA in Knochenmark und Milz bei Infektion 3 Tage p.t.**

	HHV-6A ge/ 100 humane Zellen		HHV-6B ge/ 100 humane Zellen	
	Knochenmark	Thymus	Knochenmark	Thymus
<b>CB-MNC 6 Wochen</b>	2	0	0,5	32
<b>7 Wochen</b>	4	0	1	27
<b>CD34<sup>+</sup> 6 Wochen</b>	0	0	0	0
<b>7 Wochen</b>	0	0	0	0

In diesem Versuch wurde der Unterschied zwischen CB-MNC und CD34<sup>+</sup> Zellen erneut deutlich. Nach Transplantation von CB-MNC konnte auch bei Infektion 3 Tage p.t. eine deutlich reduzierte Bildung humaner Zellen mit HHV-6A gezeigt werden. Wurden Mäuse 3 Tage nach CD34<sup>+</sup> Transplantation infiziert, so wurde ein vergleichbares Wachstum humaner Zellen beobachtet. Die Infektion mit HHV-6A führte eher zu einer leicht gesteigerten Bildung humaner Zellen im Knochenmark.

Letztlich mußte untersucht werden, ob die reduzierte Bildung humaner Zellen nach HHV-6A Infektion der transplantierten CB-MNC von der Replikation des Virus abhängt, oder durch die HHV-6A induzierte Veränderung der Zellkultur-Überstände (z.B. der darin enthaltenen Cytokine) bedingt ist. In einem ersten Versuch wurden die HHV-6 Partikel aus dem Zellkulturüberstand durch Filtration entfernt. Die Porengröße der dazu verwendeten Zentrifugationssäulen war so gewählt, daß nur Partikel der Größe von HHV-6 Virionen und größere Partikel zurückgehalten wurden. Im Kulturüberstand enthaltene Cytokine und Wachstumsfaktoren sollten bei

dieser Filtration im Filtrat erhalten bleiben. Der so erhaltene Kultur-Überstand entsprach dem Kultur-Überstand einer HHV-6A infizierten CB-MNC Kultur, aus dem nur die Viren entfernt wurden. In einem direkten Vergleich wurde dieser durch Filtration erhaltene HHV-6 freie Überstand mit dem bisher zur Mock-Infektion verwendeten Kultur-Überstand von CB-MNC verglichen. Die CB-MNC wurden unmittelbar vor der Transplantation 4 h in diesen Überständen inkubiert und direkt transplantiert. Eine Kontrollinfektion frisch stimulierter CB-MNC zeigte, daß der Kultur-Überstand nach Entfernung der HHV-6A Partikel nicht mehr infektiös war. Sechs und 7 Wochen p.t. wurden die Mäuse untersucht. Wie in Abbildung 48 gezeigt ist, konnte weder beim Anteil humaner Zellen (HLA-I<sup>+</sup>), beim Anteil hämatopoetischer Zellen (CD45<sup>+</sup>), potentieller PHSZ (CD34<sup>+</sup>) oder nicht-hämatopoetischer Zellen ein Unterschied zwischen den beiden verwendeten Kultur-Überständen festgestellt werden.

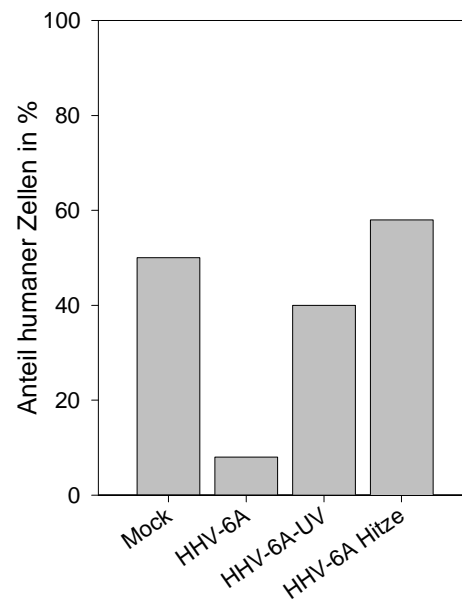


**Abbildung 48: Vergleich von Mock Kultur-Überstand mit HHV-6A Kultur-Überstand nach Entfernung der Virus-Partikel.** Anteil humaner Zellen im Knochenmark nach FACS Analyse. Gezeigt ist der Mittelwert von jeweils zwei Mäusen.

Die Entfernung der HHV-6A Partikel aus dem Kulturüberstand ist offensichtlich ausreichend, um den inhibierenden Effekt auf die Bildung humaner Zellen zu unterbinden. Der inhibierende Einfluß HHV-6A induzierter Cytokine ist demnach unwahrscheinlich.

In einem zweiten Ansatz wurden die Viren vor der Inkubation mit den zu transplanzierenden CB-MNC nicht entfernt, sondern inaktiviert. Die Inaktivierung

geschah entweder durch Erhitzen oder UV-Bestrahlung. Beim Erhitzen werden virale Proteine denaturiert, wodurch neben DNA Polymerase und weiteren für die Replikation erforderlichen Proteinen auch Membran-Proteine denaturiert werden, welche für die Infektion der Zelle notwendig sind. Durch die UV-Bestrahlung bleibt die Hülle der Viren weitgehend unverändert, d.h. deren Infektiosität bleibt erhalten. Jedoch kommt es zum Cross-Linking der DNA, wodurch so behandelte Viren nicht mehr replikationsfähig sind. In einem direkten Vergleich wurden CB-MNC unmittelbar vor der Transplantation mit Mock-, HHV-6A-, hitzeinaktiviertem HHV-6A und UV bestrahltem HHV-6A Kultur-Überstand inkubiert. Nach 6 und 7 Wochen wurden die



**Abbildung 49: Anteil humaner Zellen im Knochenmark nach Inkubation mit inaktiviertem HHV-6.** Gezeigt ist der Mittelwert aus jeweils 2 Mäusen.

Mäuse untersucht. Während es nach Inkubation der CB-MNC zu einer verminderten Bildung humaner Zellen im Knochenmark der Maus kam, waren keine Unterschiede zwischen Mäusen nach Mock-Infektion und nach Infektion mit den inaktivierten Viren zu bemerken (Abb. 49).

In den Kulturen der Kontrollinfektionen konnte nach Inaktivierung keine HHV-6 Vermehrung nachgewiesen werden.

Dieser Versuch zeigte, daß nicht-infektiöse und replikationsunfähige HHV-6 Partikel keinen Einfluß auf die Bildung humaner Zellen in der NOD/SCID Maus haben. Dieser Effekt scheint also an die Replikation von HHV-6 gekoppelt zu sein.

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

Da es in CB-CD34<sup>+</sup> transplantierten NOD/SCID Mäusen neben der Bildung humaner hämatopoetischer Zellen ebenfalls zur Bildung humaner nicht-hämatopoetischer Zellen mit Stroma- und Endothelzellcharakter kam, mußten im CD34<sup>+</sup> Zell-Transplantat zirkulierende Endothelzell-Progenitoren (ZEP) vorhanden sein, die dann in der NOD/SCID Maus zu Endothelzellen differenzieren. Deshalb wurde versucht diese Zellen *in vitro* aus CD34<sup>+</sup> Zellen zu generieren (CD34-LTC). Zum Schutz der ZEP vor Apoptose, wurden die verwendeten Kulturflaschen mit Fibronektin oder Gelatine beschichtet. Fibronektin gehört zur Gruppe der adhäsiven Glykoproteine, die im Bindegewebe den Kontakt zu den dort eingelagerten Zellen vermitteln. Durch mehrtägige Inkubation in serumfreiem Medium ohne Hämatopoese fördernde Cytokine sollten die NHZ angereichert und die hämatopoetischen Zellen weitestgehend entfernt werden. Zum Auswuchs der Kolonien wurden proliferationsfördernde Cytokine zugesetzt. Die Auswertung erfolgte nach der Morphologie der Kolonien, deren immuncytologischer Charakterisierung und eigens zu diesem Zweck entwickelten RT-PCR Tests, welche endothelzell-spezifische RNAs nachweisen.

### V.1 Morphologische Charakterisierung

CB-CD34<sup>+</sup> Zellen wurden mit der MACS Methode angereichert und sofort in Fibronektin oder Gelatine beschichtete Kulturflaschen eingesät. Nach 2-3 Tagen waren einzelne Zellen am Boden angeheftet. Obwohl diese Kolonien sehr vereinzelt waren, bildeten sich nach 20 Tagen in Medium EWM4 rasch wachsende fibroblastenähnliche Kolonien, die bei Erreichen von Stecknadelkopfgröße auch hämatopoetische, runde Zellen produzieren konnten, welche sich bald ablösten und im Kulturüberstand schwammen. In Medium EWM1 wuchsen vorrangig Dendriten aus und vermehrten sich deutlich. Dabei traten auch große, differenzierte follikuläre Dendriten mit zahlreichen Kernen auf. Die Bildung von langgestreckten Fibroblasten und Endothelzellen schien durch bFGF und EPO gefördert zu werden. Von der Morphologie der gebildeten Zellen kann man auf Zellen mit stromalem Charakter schließen.

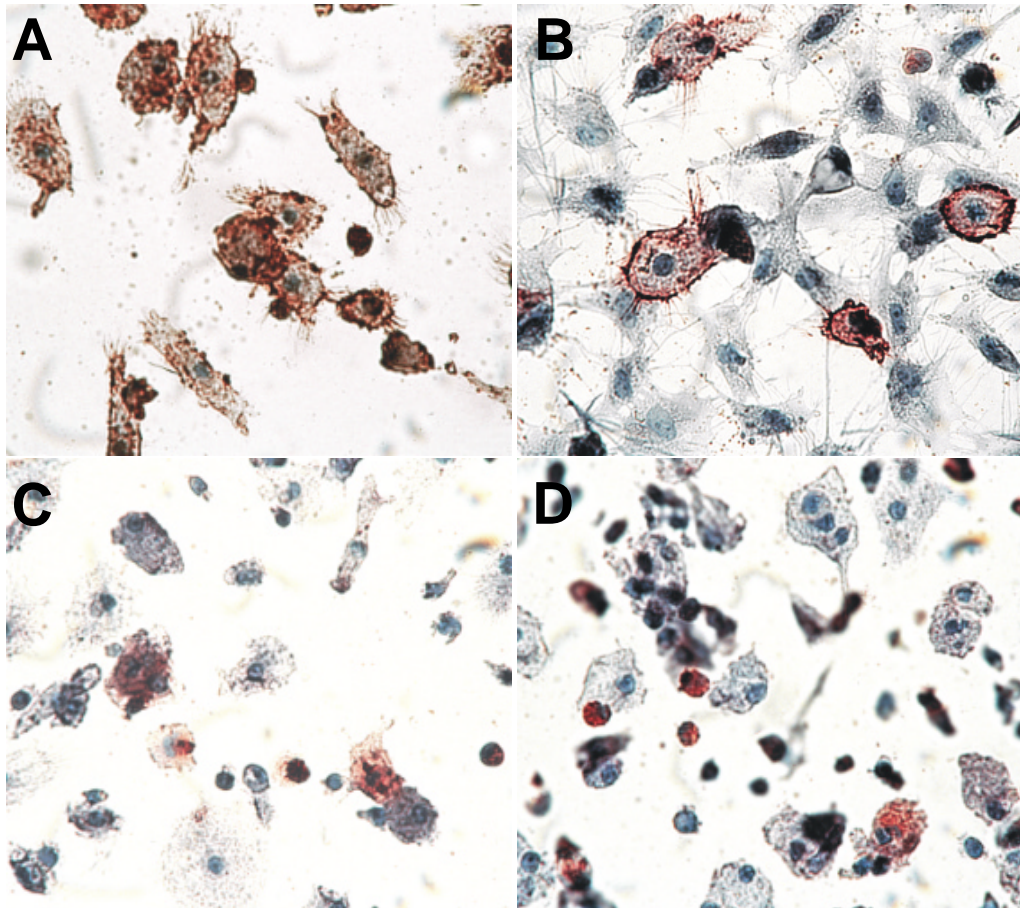
### V.2 Immuncytochemische Charakterisierung

Nach ~20 Tagen in Kultur mit Medium EWM4 wurden die ausgewachsenen Zellen immuncytochemisch gefärbt. Dabei wurden die gleichen mAb verwendet, wie zum Nachweis von NHZ in chimären Mäusen: mAb gegen Fibroblasten (Fib-Serie) und gegen Endothelzellen (EN-4: CD31 Epitop; vWF: von Willebrand Faktor; KDR:



VEGF-2R). Gleichzeitig wurden die in Kultur genommenen CD34<sup>+</sup> mit diesen mAb charakterisiert.

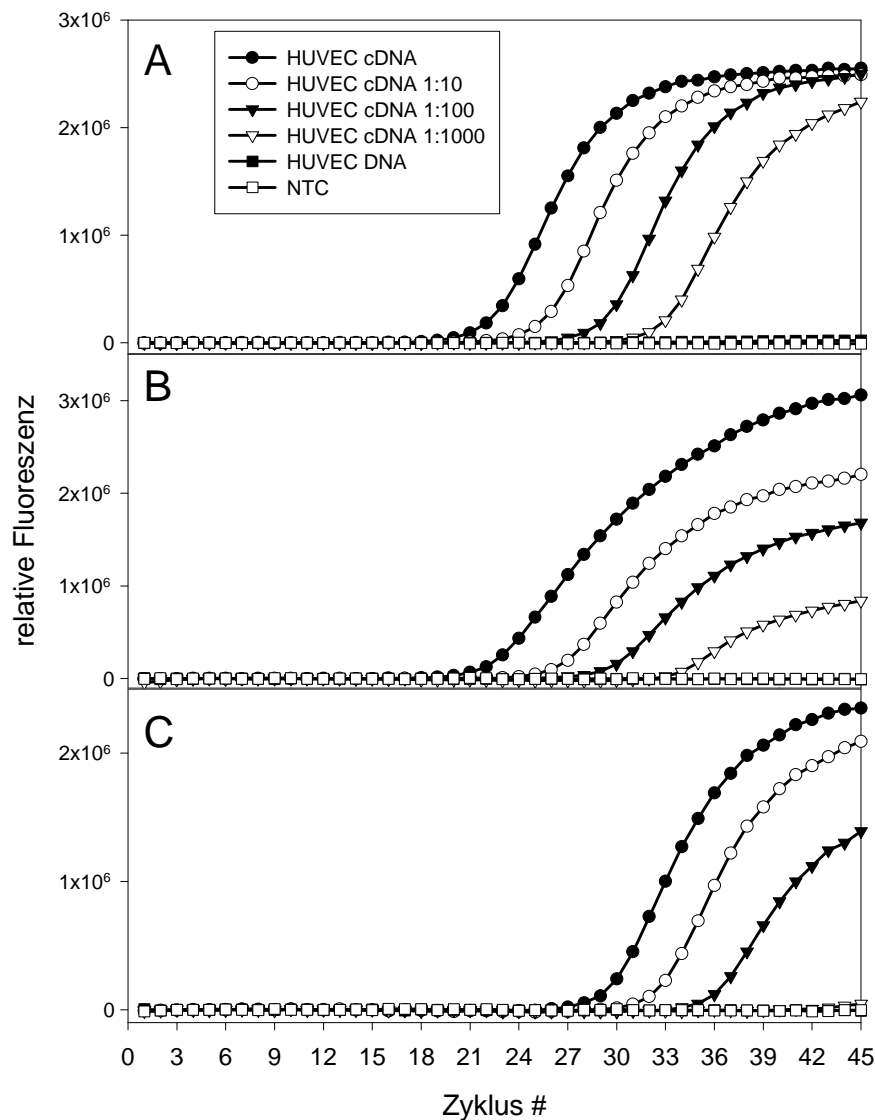
In der CD34<sup>+</sup> Zellfraktion waren durchschnittlich  $5,0 \pm 0,5$  % der Zellen EN-4 positiv,  $0,2 \pm 0,1$  % der Zellen vWF positiv und  $0,4 \pm 0,4$  % der Zellen Fib positiv. Während in einzelnen Versuchen vWF und Fib negative CD34<sup>+</sup> auftraten, war in 3/3 untersuchten CD34<sup>+</sup> Zellfraktionen EN-4 nachweisbar. Nach ~20 Tagen in Kultur mit Medium EWM4 waren alle Kulturen unterschiedlich stark positiv für die Marker EN-4, vWF, Fib, sowie KDR. Abbildung 50 zeigt einige Beispiele. Die HLA-I Färbung und die EN-4 Färbung (50A, B) zeigen deutlich die typische Morphologie von Endothelzellen. In insgesamt 6 unabhängigen Versuchen war der Marker EN-4 in höheren Anteilen nachweisbar, als die Marker vWF, Fib und KDR. Nach Stimulation mit VEGF konnte der Anteil der KDR und vWF positiven Zellen erhöht werden.



**Abbildung 50: POX Färbung von CD34-LTC nach ~20-tägiger Kultivierung in Medium EWM4.** Abb. 41A: HLA-I; Abb. 41B: EN-4, Abb. 41C: Fib-3; Abb. 41D: vWF.

### V.3 Nachweis von KDR, vWF und CD31 RNA mittels RT-PCR

Zum molekularbiologischen Nachweis von endothelzell-spezifischen Genen, wurden drei unabhängige PCR Tests etabliert. Die 3 Tests sind so konstruiert, daß alle unter den gleichen Temperaturbedingungen spezifisch cDNA amplifizieren. Die Amplifikation von kontaminierender genomischer DNA ist dabei durch die Größe der eingeschlossenen Introns unter den hier gewählten Bedingungen ausgeschlossen.

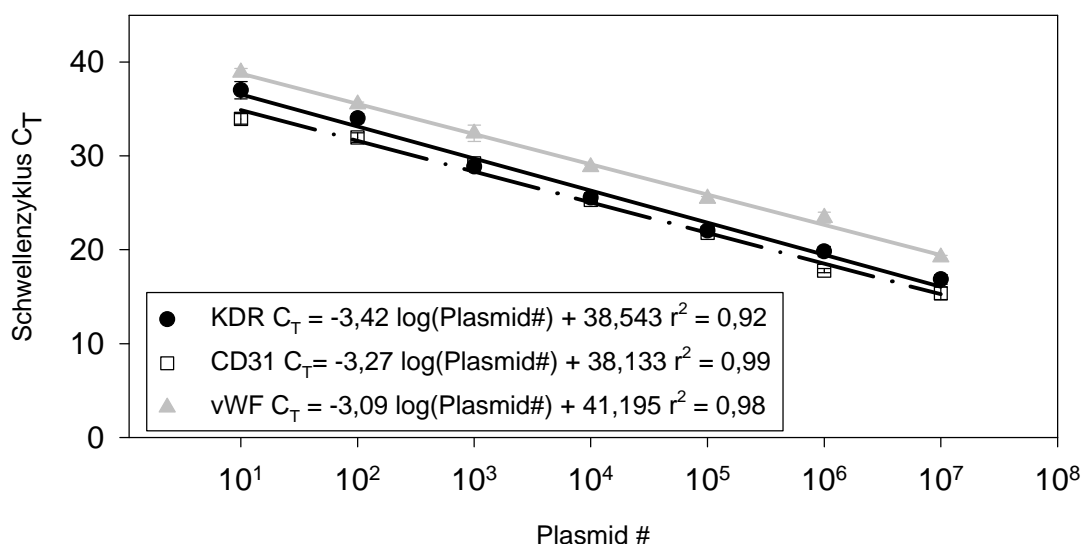


**Abbildung 51: Amplifikationskurven von RT-PCR Tests zum Nachweis von CD31, KDR und vWF RNA.** Abb. 52A: CD31-RNA, Abb. 52B: KDR-RNA und Abb. 52C: vWF-RNA. Als Matrize wurde cDNA von VEGF-2 stimulierten HUVEC verwendet. Als Negativkontrolle diente DNA aus den gleichen Zellen, die zu keiner Signalbildung führt.

Als Positivkontrolle wurde cDNA aus VEGF stimulierten HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) verwendet. Mit der optimierten PCR erhielt man diskrete Banden in der erwarteten Größe. Danach wurden Exonuklease-Sonden konstruiert, welche die Quantifizierung der 3 Gene nach dem Prinzip der TaqMan Echt-Zeit PCR

erlaubten. Nach Anpassung der Reaktionsbedingungen an die Echt-Zeit PCR, konnten mit Verdünnungsreihen von HUVEC cDNA Amplifikationskurven erstellt werden. Wie in Abbildung 51 gezeigt, können alle 3 Gene quantitativ nachgewiesen werden.

Da die Kurven für CD31 (Abb. 51A) und KDR (Abb. 51B) früher ansteigen als für vWF (Abb. 51C), scheint die Expression von CD31 und KDR stärker als die vWF Expression zu sein. Die 1:1000 Verdünnung der HUVEC cDNA liefert kein meßbares Signal mehr für vWF. Da eine weitere Erklärungsmöglichkeit eine geringere Sensitivität der vWF PCR ist, wurden Plasmide für jedes der 3 Zielgene kloniert. Von den 3 resultierenden Plasmiden pCD31, pKDR und pvWF wurden Verdünnungsreihen von  $10^7$ - $10^1$  Plasmiden angefertigt und mit dem entsprechenden Test gemessen. Analog der Kalibrierung der TM-PCR zum Nachweis von HHV-6 DNA konnten Standardgeraden aus den  $C_T$ -Werten und der eingesetzten Plasmid-Anzahl erstellt werden. Abbildung 52 zeigt, daß jeder der 3 Tests das entsprechende Gen in einem Bereich von  $10^7$ - $10^1$  Plasmidkopien linear nachweisen kann.



**Abbildung 52: Standardgeraden für den quantitativen Nachweis von KDR-RNA, CD31-RNA und vWF-RNA.** Alle 3 Tests haben bei hoher Korrelation einen linearen Nachweisbereich von  $10^1$ - $10^7$  Zielgenen.

CD34-LTC wurden wie beschrieben angelegt. Nach ~20 Tagen in Kultur wurde daraus RNA extrahiert und anschließend cDNA synthetisiert. Diese wurde in Doppelproben mit den TaqMan Tests zum Nachweis von CD31, KDR und vWF gemessen. Die Expression aller drei Gene war nachweisbar. Als Referenz wurde das humane  $\beta$ -Aktin Gen amplifiziert. Mit Hilfe einer dafür bekannten Standardgeraden konnte dann die Anzahl der Gen-Kopien von CD31, KDR und vWF auf die Anzahl der in der cDNA Probe vorhandenen Aktin-Gene bezogen werden. So konnten in diesem Versuch ~159 Kopien CD31/100 Aktine, ~687 Kopien KDR/100 Aktine und

827 Kopien vWF/100 Aktine gemessen werden. In CD34<sup>+</sup> Zellen vor der Kultivierung konnte weder RNA von CD31, KDR oder vWF detektiert werden.

#### **V.4 Einfluß von HHV-6 auf die Endothelzellbildung *in vitro***

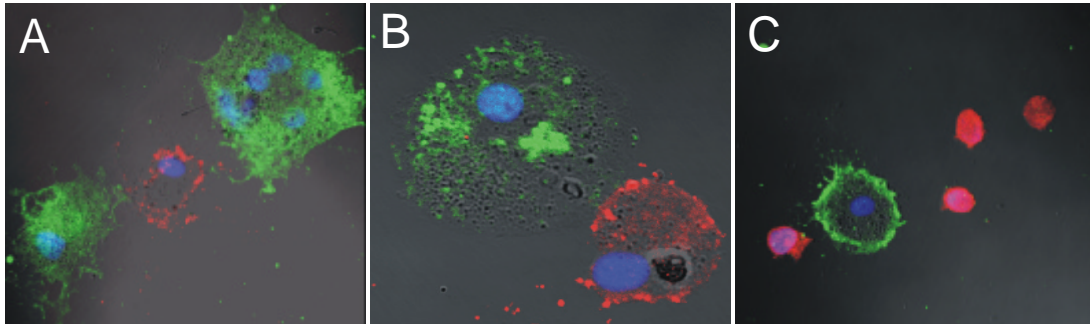
Unter den genannten Bedingungen ist also die Differenzierung von CD34<sup>+</sup> Zellen zu Endothelzellen gelungen. Endothelzell-spezifische Antigene und RNAs ließen sich in CD34-LTC nachweisen. Um zu untersuchen, welchen Einfluß HHV-6 auf diese Differenzierung zu Endothelzellen *in vitro* hat, wurden die CD34<sup>+</sup> 7 Tage nach dem Einsäen 4h mit HHV-6-haltigen Zellkulturüberständen inkubiert. Als Kontrolle wurde der Zellkulturüberstand einer nicht infizierten CB-MNC Kultur verwendet (Mock Infektion). Die Zellen wurden gewaschen und mit EWM4 Medium in Kultur genommen.

In allen Kulturen war das Wachstum in den darauf folgenden ersten 7 Tagen vergleichbar, die Zellen adhärten an den Flaschenboden und begannen sich auszustrecken. Die Anzahl von nicht-adhären Zellen im Überstand war ebenfalls vergleichbar nach Mock Infektion und HHV-6A bzw. HHV-6B Infektion. Nach 14 Tagen in Kultur traten die ersten deutlichen Unterschiede auf: in Kulturen nach HHV-6B Infektion waren weniger Zellen adhären als in Kulturen nach Mock- oder HHV-6A Infektion. Insgesamt enthielten die HHV-6 infizierten Kulturen sehr viel mehr nicht zu identifizierende, kleine, pyknotische Zellen. Zellen mit charakteristischer Endothelzell-Morphologie waren selten.

Nach immunocytochemischer Färbung der CD34-LTC fiel auf, daß in den Kulturen nach Kontrollinfektion neben EN-4 positiven Zellen auch vWF und KDR positive Zellen auftraten. Dagegen waren in Kulturen nach HHV-6 Infektion lediglich EN-4 positive nachweisbar, aber keine vWF oder KDR positiven Zellen. Die Färbung dieser Zellen mit den HHV-6 spezifischen mAb H-AR-2 und gp106 führte zur unspezifischen Färbung aller Zellen, auch der Mock infizierten Zellen. Vermutlich handelt es sich dabei um eine Unverträglichkeit des verwendeten LSAB Kits mit den HHV-6 Antikörpern. Deshalb wurden diese Versuche wiederholt und die Kulturen mit dem IFA gefärbt. Dazu wurden Doppelfärbungen nach dem in C.I.1.2 beschriebenen Prinzip gefärbt. Neben dem mAb H-AR-2bio zum Nachweis von HHV-6 wurden die mAb EN-4, Fib3 und vWF zum Nachweis von Endothelzellen und Fibroblasten verwendet. Abb. 53 zeigt die cLSM Aufnahmen dieser Färbungen.

Am deutlichsten waren mit dem IFA EN-4 positive Zellen nachweisbar (Abb. 53A, grün). Diese Zellen hatten eine vergleichbare Größe, wie die EN-4 positive Zellen nach POX Färbung (siehe Abb. 50B). Sehr vereinzelt waren mit dem IFA Fib3 positive Zellen und vWF positive Zellen nachweisbar (Abb. 53B und C; grün). Die Fib3 Färbung war sehr diffus. HHV-6 positive Zellen (rot) waren in unterschiedliche

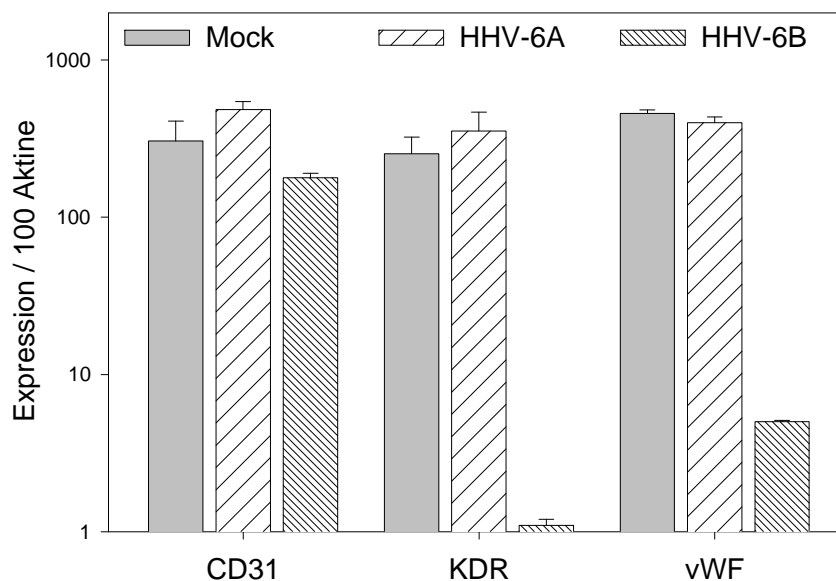
Größe ebenfalls selten nachweisbar (<10%), jedoch fast ausschließlich in Kulturen nach HHV-6B Infektion. Häufig waren die HHV-6 positiven Zellen sehr klein und pyknotisch. Bei keinem der durchgeführten Versuche konnte ein HHV-6 Signal gleichzeitig mit dem Signal der Endothelzell-spezifischen Antikörper gefunden werden. HHV-6A positive Zellen konnten nicht eindeutig identifiziert werden.



**Abbildung 53: IFA Doppelfärbungen von CD34<sup>+</sup>-LTC in Medium EWM4 nach Inkubation mit HHV-6B.** HHV-6 wurde mit mAb H-AR-2bio und Streptavidin/TMR nachgewiesen (rot). Die mAb EN-4 (Abb. 53A, 1000x), Fib3 (Abb. 53B, 1000x) und vWF (Abb. 53C, 500x) wurden mit Maus-spezifischen IgG/Alexa488 nachgewiesen (grün). Zellkerne sind mit DAPI blau gefärbt.

In einem weiteren Versuch wurde 22 Tage nach Mock, HHV-6A und HHV-6B Infektion RNA aus den Zellen extrahiert und nach cDNA Synthese mit den 3 PCR Tests zum Nachweis von CD31, KDR und vWF RNA untersucht. Als Referenz-Gen wurde wieder  $\beta$ -Aktin amplifiziert und die bekannte Standardgerade verwendet. Es konnte gezeigt werden, daß die Expression von CD31 nicht wesentlich durch die Infektion mit HHV-6 verändert wird (die veränderte Expression nach HHV-6A und HHV-6B liegt im Bereich der methodischen Schwankungen). Diese Ergebnisse decken sich mit denen der immunocytochemische Färbung, die auch keine veränderte Expression des CD31 Antigens, EN-4, nach HHV-6 Infektion zeigte. Die Expression von KDR und vWF war dagegen nach HHV-6B Infektion deutlich reduziert. HHV-6A hatte auf die Expression dieser Gene keinen Einfluß. Hier tritt eine Diskrepanz zu den Ergebnisse der POX Färbung auf, bei der nach Infektion mit beiden HHV-6 Varianten weder KDR noch vWF nachweisbar waren. Abbildung 54 zeigt die Anzahl der nachgewiesenen Gene von CD31, KDR und vWF, jeweils bezogen auf 100 Aktine.

Da vorhergehende Versuche Hinweise darauf gegeben haben, daß durch eine HHV-6 Infektion die  $\beta$ -Aktin Expression reduziert wird und  $\beta$ -Aktin damit als Referenz-Gen ungeeignet sein könnte, wurde ergänzend ein Bereich 18S ribosomaler RNA als Referenz-Gen amplifiziert. Die mit dem 18S-Referenz-Gen erhaltenen Ergebnisse waren vergleichbar mit denen der  $\beta$ -Aktin Referenz-Gen Messung.



**Abbildung 54: Quantifizierung von CD31, KDR und vWF RNA in CD34-LTC nach Infektion mit HHV-6.** Die Anzahl der RNA Transkripte ist aus den Standardgeraden aus Abb. 52 abgeleitet.

Um die Replikation von HHV-6 in diesen Kulturen nachzuweisen, wurde mit der TM-PCR zum quantitativen Nachweis von HHV-6 die Viruslast im Überstand im Verlauf der Kultivierung bestimmt. Dazu wurde beim Füttern der Kulturen Medium abgenommen, 1/10 mit Aqua bidest. verdünnt und mit der HHV-6 TM-PCR gemessen. HHV-6 DNA war nach Infektion mit beiden Varianten während des ganzen Verlaufs nachweisbar, die Viruslast war jedoch konstant. Da die Anzahl der infizierten Zellen in diesen Kulturen jedoch sehr gering war, scheint es ohnehin fraglich, ob Veränderungen in der Viruslast einer Zellkultur solch geringer Zelldichte mit der PCR erkannt werden können. Wurden die cDNA Proben mit der TM-PCR zum Nachweis von HHV-6 gemessen, so ließen sich HHV-6A und HHV-6B RNA in sehr geringer Menge nachweisen.

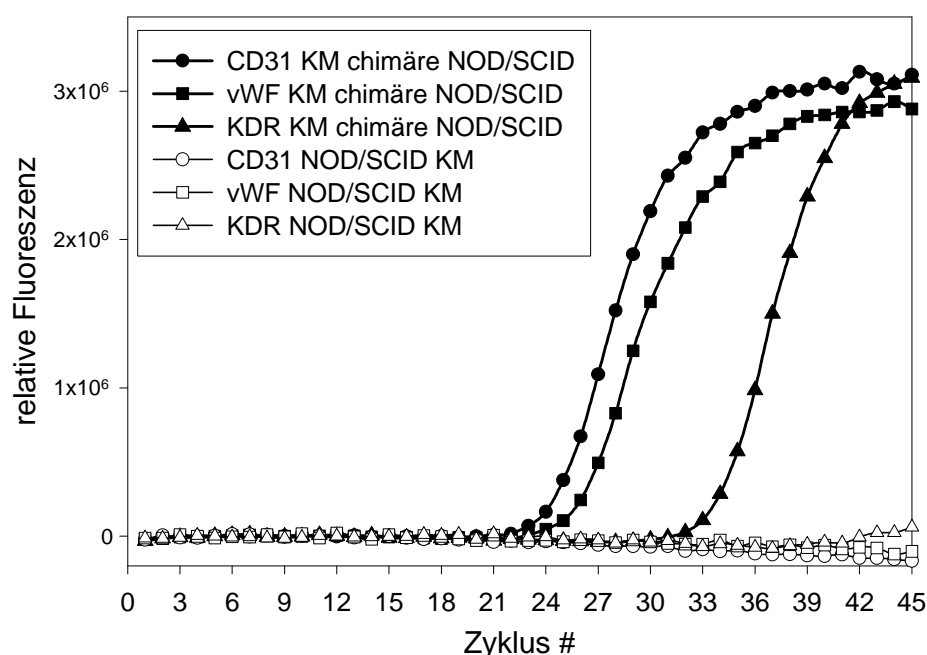
In weiteren Versuchen wurde die Infektion direkt vor der Kultivierung der CD34<sup>+</sup> Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse waren zwar vergleichbar, jedoch im Ausmaß nicht so extrem wie bei Infektion vor der Kultivierung.

Wie in diesen Versuchen gezeigt wurde, ist die Differenzierung von CD34<sup>+</sup> Zellen zu Endothelzellen nach Infektion mit HHV-6 beeinträchtigt. Die Aufklärung des Mechanismus und die Auswirkungen auf bestimmte endothelzell-spezifische Gene erfordert weitere Untersuchungen.

### V.5 Nachweis von CD31, KDR und vWF RNA in chimären Mäusen

Obwohl bei der Auswahl der Primer zum Nachweis von CD31, KDR und vWF RNA darauf geachtet wurde, daß die Primer nur die humanen Gene, jedoch nicht die murinen homologen Gene binden können, mußte untersucht werden, ob diese PCR

Tests zum Nachweis der endothelzell-spezifischen Gene auch in chimären Mäusen geeignet sein würden. Dazu wurde aus einer transplantierten NOD/SCID Maus und einer nicht-transplantierten Kontrollmaus das Knochenmark entnommen und daraus die RNA extrahiert. Nach cDNA Synthese wurde diese mit den PCR Tests zum Nachweis von CD31-RNA, KDR-RNA und vWF-RNA gemessen. Während es bei cDNA des Knochenmarks der Kontrollmaus zu keiner Signalbildung kam, waren in



**Abbildung 55: Quantitativer Nachweis von CD31, vWF und KDR RNA in Knochenmark einer chimären NOD/SCID Maus.** Mit cDNA einer nicht-transplantierten Kontrollmaus kommt es zu keiner Signalbildung.

cDNA der transplantierten NOD/SCID Maus alle drei humanen Gene nachweisbar. Abbildung 55 zeigt die Amplifikationskurven für CD31, KDR und vWF erstellt mit cDNA der Kontrollmaus und cDNA einer transplantierten NOD/SCID Maus 9 Wochen p.t.

Wie diese ersten Ergebnisse zeigen, kann mit diesen RT-PCR Tests in weiteren Versuchen die Bildung nicht-hämatopoetischer Zellen in chimären NOD/SCID Mäusen und daraus angelegten LTBMK und der Einfluß von HHV-6 oder humanem IL-3 auch auf transkriptioneller Ebene untersucht werden. Als Referenz-Gen könnte hierbei der Test zum Nachweis von 18S RNA verwendet werden. Die Sequenzen humaner und muriner 18S RNA sind so stark konserviert, daß dieser Test cDNA beider Spezies mit gleicher Effizienz erkennt.