

Interaktion des Masernvirus mit humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Ibrahim Boussaad

aus Köln

Würzburg, Mai 2011

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter :

Gutachter:

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Erklärungen gem. § 4 Abs. 3 S. 3, 5 und 8 der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbständig angefertigt und keine anderen als die genannten Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe bisher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlichen Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Ibrahim Boussaad

Würzburg, im Mai 2001

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Masernvirus	1
1.1.1	Taxonomie und Morphologie	1
1.1.2	Das Genom und die viralen Proteine	3
1.1.3	Replikationszyklus	6
1.2	Epidemiologie und Pathogenese	8
1.2.1	Subakute sklerosierende Panenzephalitis (SSPE)	10
1.2.2	MV-induzierte Immunsuppression	11
1.3	Knochenmarkszellen	13
1.3.1	Zellen der hämatopoetische Stammzellnische	14
1.3.2	Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen	16
1.3.3	Leukämische Stamm-/Vorläuferzellen	17
1.4	Ziel der Arbeit	19
2	Material	21
2.1	Zellen	21
2.1.1	Zelllinien	21
2.1.2	Primäre Zellen	22
2.2	Viren	23
2.3	Zellkulturmedien	23
2.4	Antikörper	25
2.5	Kits	26

2.6	Primer.....	27
2.7	Lösungen und Puffer.....	28
2.8	Chemekalien	31
2.9	Verbrauchsmaterialien	33
2.10	Geräte.....	34
2.11	Software.....	35
3	Methoden	36
3.1	Zellkultur.....	36
3.1.1	Kultivierung von Zelllinien	36
3.1.2	Humane hämatopoetische Stamm/Vorläuferzellen (HS/PC)	36
3.1.3	Kolonienwachstumstest (colony forming assay, CFA)	39
3.1.4	Knochenmarksstromazellen	39
3.1.5	Primäre T-Zellen.....	40
3.1.6	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	40
3.1.7	Kryokonservierung.....	41
3.2	Virologische Methoden.....	41
3.2.1	Viruszucht.....	41
3.2.2	Bestimmung des Virustiters	43
3.2.3	Infektion von Zelllinien und primären Zellen	44
3.2.4	Virustransmission in Kokultur.....	45
3.2.5	Infektionsblockierung mittels Antikörper	46

3.3	Durchflusszytometrie.....	47
3.3.1	Oberflächenfärbung.....	47
3.3.2	Durchflusszytometrische Sortierung von Zellen.....	48
3.3.3	CFSE-Färbung.....	48
3.3.4	Durchflusszytometrische Bestimmung der Infektionsrate	49
3.4	Fluoreszenzmikroskopie.....	50
3.5	Molekularbiologische Methoden.....	51
3.5.1	RNA-Isolierung	51
3.5.2	Reverse Transkription.....	51
3.5.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und <i>nested</i> -PCR	52
3.5.4	Agarosegelelektrophorese.....	53
3.6	Proteinbiochemische Methoden	54
3.6.1	Aufreinigung monoklonaler Antikörper.....	54
3.6.2	Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration	55
3.7	Tierversuche	56
3.7.1	Xenotransplantation.....	56
3.7.2	Organentnahme.....	56
3.7.3	Herstellung von Einzelzellsuspensionen der Organe.....	57
4	Ergebnisse.....	58
4.1	Phänotypisierung von HS/PC.....	58
4.1.1	HS/PC exprimieren die SLAM-Marker	58

4.1.2	Subpopulationen humaner HS/PC lassen sich nicht aufgrund des.....	61
	SLAM-codes definieren	61
4.2	Differenzierungspotential der CD34 ⁺ /CD150 ⁺ -HPC.....	63
4.2.1	CD34 ⁺ /CD150 ⁺ - und CD34 ⁺ /CD150 ⁻ -Zellen differenzieren	63
	gleichermaßen <i>in vitro</i>	63
4.2.2	Beide Subpopulationen differenzieren zu Lymphozyten <i>in vivo</i>	65
4.3	Infektion von HS/PC mit MV	66
4.4	Interaktion der Stammzellnische mit MV	71
4.4.1	MV infiziert Knochenmarksstromazellen.....	71
4.4.2	Knochenmarksstromazellen und HS/PC übertragen beide MV	77
4.4.1	Infizierte Lymphozyten können MV auf Stromazellen übertragen.....	77
4.4.2	HS/PC werden effizienter durch den Kontakt mit infizierten	80
	Lymphozyten infiziert als durch freies Virus	80
4.5	Effekt von MV-Exposition auf die Kolonienbildung.....	82
4.5.1	MV-Exposition wirkt sich nicht auf die Kolonienzahl im CFA aus.....	82
4.5.2	MV-Exposition vermindert die Kolonienzahl CD150 ⁺ -HPC nicht.....	84
4.6	Rekonstitution von NOD/SCID-IL2R γ ^{-/-} -Mäusen nach MV- Exposition	85
4.6.1	MV hat keine Auswirkung auf die Langzeitrekonstitution <i>in vivo</i>	85
4.6.1	MV-Exposition inhibiert die Kurzzeitrekonstitution <i>in vivo</i>	87
4.6.2	Die Migration der HS/PC <i>in vivo</i> wird durch MV nicht beeinträchtigt.....	88
5	Diskussion	91
6	Zusammenfassung.....	107

7	Summary.....	109
8	Literaturverzeichnis	110
9	Abkürzungsverzeichnis	125
10	Veröffentlichung.....	129
11	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
12	Danksagung.....	130

1 Einleitung

Die besonders im Kindesalter auftretenden akuten Masern sind eine durch Tröpfcheninfektion mit dem Masernvirus (MV) übertragene, hochansteckende Krankheit. Das phylogenetisch sehr junge Virus entstand vermutlich aus dem Rinderpestvirus, das auf Grund des engeren Kontakts von Menschen und Rindern, den die Nutztierhaltung mit sich brachte, die Speziesbarriere überwinden konnte (McNeill, 1976). Bisher wurde vermutet, dass das MV vor ca. 6000 Jahren entstanden ist (Black, 1965), da es nur in Populationen ab einigen Hunderttausend oder mit mindestens 5000 Geburten pro Jahr endemisch werden kann. Fehlende frühe historische Beschreibungen der Masern, sprachwissenschaftliche Untersuchungen des Namens sowie neue phylogenetische Analysen viraler RNA weisen jedoch darauf hin, dass das MV vermutlich erst zwischen dem 5. und 12. Jahrhundert n. Chr. entstand und in der menschlichen Bevölkerung endemisch wurde (Furuse et al, 2010; McNeill, 1976; Retief & Cilliers, 2010). Das in seiner heutigen Form vorkommende MV ist unter natürlichen Bedingungen strikt humanpathogen, auch wenn gezeigt werden konnte, dass im Tierversuch einige Primatenarten infizierbar sind und diese maserntypische Symptome aufweisen (de Swart et al, 2007; McChesney et al, 1997), und dass eine MV-Infektion auch bei Primaten, die in Gefangenschaft leben, serologisch nachgewiesen werden kann (Kalter et al, 1997).

1.1 Das Masernvirus

1.1.1 Taxonomie und Morphologie

Das MV gehört zur Familie der Paramyxoviridae, die Teil der Ordnung der *Mononegavirales* ist. Diese Ordnung umfasst neben den *Paramyxoviridae* noch die Familien *Bornaviridae*, *Rhabdoviridae* und *Filoviridae*, bei denen es sich um behüllte Viren mit einem einzelsträngigen, nichtsegmentierten RNA-Genom, das eine negative Polarität aufweist, handelt. Die *Paramyxoviridae* werden in die zwei Unterfamilien *Paramyxovirinae* und *Pneumovirinae* unterteilt, die wiederum aus 5 bzw. 2 Genera bestehen. Das MV bildet innerhalb der *Paramyxovirinae* zusammen mit dem Hundestaupavirus (CDV), Seehundestaupavirus (PdV), Pest der kleinen Wiederkäuer-Virus (PPRV), Delphinmorbillivirus (DMV), Tümmlermorbillivirus (PMV)

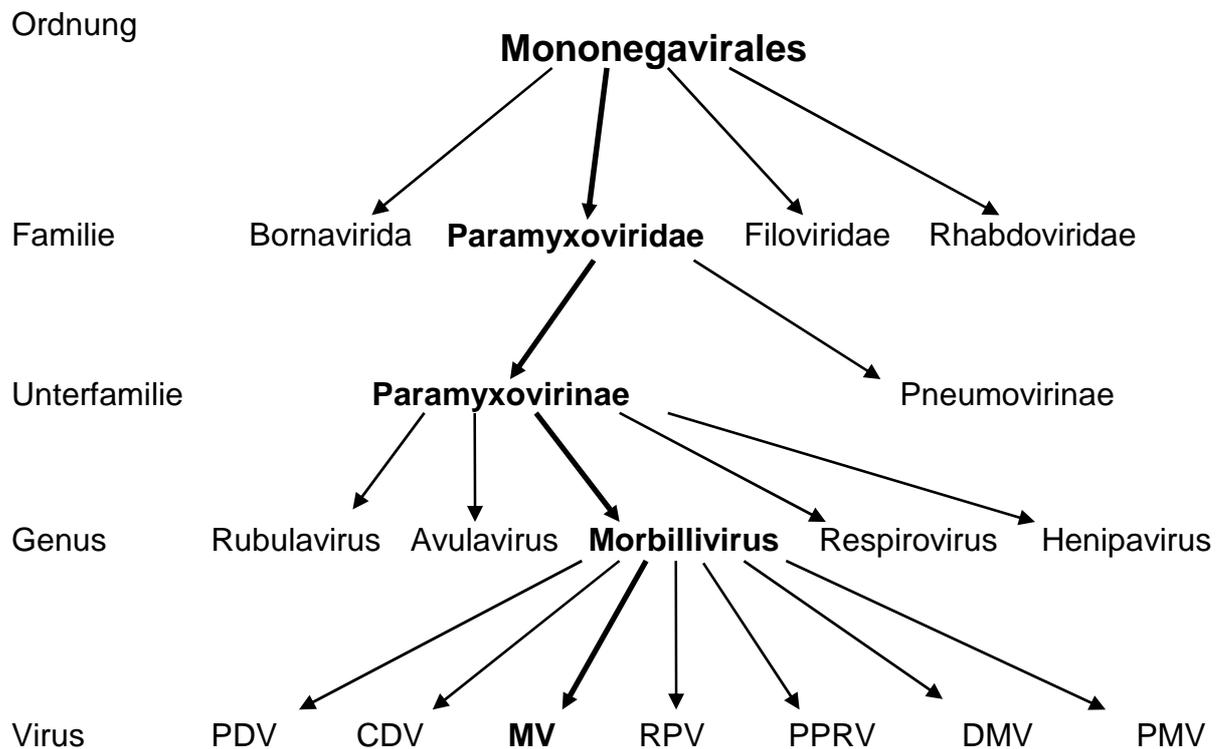


Abb.: 1.1 Taxonomische Gliederung der Paramyxovirinae

PDV: Seehundestaubevirus, CDV: Hundestaubevirus, MV: Masernvirus, RPV: Rinderpestvirus, PPRV: Pest der kleinen Wiederkäuer-Virus, DMV: Delphinmorbillivirus, PMV: Tümmlermorbillivirus

und dem Rinderpestvirus (RPV) den Genus *Morbillivirus* (Abb.: 1.1). Allen Mitgliedern dieses Genus fehlt die Neuraminidaseaktivität ihrer Glykoproteine. Masernviren werden weiterhin anhand von Sequenzvergleichen des C-terminalen Abschnitts des N-Gens (Nukleokapsid) in verschiedene Genotypen unterteilt, die alle weltweit zirkulieren bzw. zum Teil ausgestorben sind (Rima et al, 1995; Taylor et al, 1991). Trotz der verschiedenen Genotypen weist das MV eine hohe Antigenstabilität auf, in Folge derer nur ein Serotyp existiert.

Das MV ist ein pleomorphes Partikel mit einer Größe von 120 bis 270nm, das eine Lipidhülle besitzt, die mit sogenannten *spikes* besetzt ist. Die Lipidhülle leitet sich während der Knospung neuer Viruspartikel von der Zellmembran der Wirtszelle ab und die eingelagerten *spikes* bestehen aus den viralen Glykoproteinen H

(Hämagglutinin) und F (Fusionsprotein). Die zytoplasmatischen Domänen der Glykoproteine interagieren an der Innenseite des Partikels mit dem Matrixprotein (M), dass das Virus von innen auskleidet. Diese virale Hülle umschließt einen helikalen Ribonukleoproteinkomplex (RNP), der aus der viralen RNA, dem Nukleokapsidprotein (N), dem Phosphoprotein (P) und der viralen RNA-Polymerase (L) zusammengesetzt ist (Morgan & Rapp, 1977).

1.1.2 Das Genom und die viralen Proteine

Genomaufbau

Das MV besitzt ein einzelsträngiges, nichtsegmentiertes RNA-Genom negativer Polarität, das eine Größe von ca. 16 Kilobasen aufweist. Es besteht aus 6 Genen, die für 8 Proteine kodieren und von zwei nichtkodierenden Sequenzen, der 3'-*leader*- und der 5'-*trailer*-Sequenz, flankiert werden. Diese Sequenzen enthalten die Promotorsequenzen für die virale Transkription (nur in der 3'-*leader*-Sequenz) und Replikation sowie ein Verpackungssignal für die Interaktion mit dem N-Protein (Horikami & Moyer, 1995). Bei der Verpackung interagieren stets 6 Nukleotide des Genoms mit einem N-Protein, sodass nur Genome, deren Nukleotidsequenz ein Vielfaches von 6 darstellt, replikationsfähig sind (Calain & Roux, 1993). Die Gene der gleichnamigen Proteine sind wie folgt zwischen den nichtkodierenden Sequenzen angeordnet: 3'-*leader* --- N --- P --- M --- F --- H --- L --- 5'-*trailer*. Bis auf das P-Gen kodieren alle Gene für ein virales Protein. Durch alternative Initiation bzw. posttranskriptionelle Insertion eines Nukleotids in die P-mRNA entstehen zusätzlich die beiden Nichtstrukturproteine C und V (Liston & Briedis, 1995; Liston et al, 1995). Die viralen Gene sind durch nichtkodierende, intergenische Sequenzen (IGS) voneinander getrennt. Die IGS enthalten die Informationen für die Polyadenylierung der mRNA und für die Termination bzw. Reinitiation der Transkription (Bellini et al, 1994).

N-Protein

Das Nukleokapsidprotein ist ca. 60 kDa groß und das am häufigsten translatierte, virale Protein in einer infizierten Zelle. Es bindet N-terminal je 6 Nukleotide viraler, genomischer RNA, was zur Bildung des Nukleokapsid führt und die RNA

unempfindlich gegen zelluläre Ribonukleasen macht. Neben der Enkapsidierung der genomischen RNA interagiert es außerdem noch über das P-Protein mit dem viralen RNA-Polymerasekomplex (Gombart et al, 1995).

P- und L-Proteine

Die beiden Proteine P und L bilden zusammen den viralen Polymerasekomplex, der sowohl für die Transkription als auch für die Replikation essentiell ist. Da das virale Genom eine negative Polarität besitzt, kann es nicht als mRNA dienen. Daher ist die Anwesenheit des Polymerasekomplexes im Viruspartikel essentiell für seine Replikationsfähigkeit. Die eigentliche Polymerase, das 220 kDa große L-Protein, ist sowohl in der Lage, mRNA der einzelnen Gene, als auch Transkripte des gesamten Genoms anzufertigen. Diese so genannten anti-Genome mit positiver Polarität dienen dann als Matrize für die Synthese neuer Genome. Für die Polymeraseaktivität bedarf das L-Protein der Bindung des 72 kDa großen P-Proteins als Kofaktor. Weiterhin ist das L-Protein verantwortlich für das capping und die Polyadenylierung der viralen Transkripte (Cevik et al, 2004; Duprex et al, 2002; Rima & Duprex, 2005). Des Weiteren bewirkt das L-Protein die Insertion eines Guanosins in die P-mRNA, wodurch das C-terminal cysteinreiche V-Protein entsteht (Cattaneo et al, 1989; Liston & Briedis, 1995). Das V-Protein fungiert sowohl als Inhibitor der Apoptose in infizierten Zellen (Cruz et al, 2006) als auch als negativer Regulator der viralen Polymeraseaktivität (Tober et al, 1998). Durch die Verwendung eines alternativen Startkodons im P-Gen kommt es darüber hinaus zur Expression des stark basischen C-Proteins, das ebenfalls die Polymeraseaktivität hemmt, aber auch die Synthese neuer infektiöser Partikel verstärkt (Bellini et al, 1985; Fontana et al, 2008). Darüber hinaus manipulieren alle drei Proteine des P-Gens die zelluläre Interferonantwort (Devaux et al, 2007; Fontana et al, 2008).

M-Protein

Das 37 kDa große Matrixprotein ist eines der drei Hüllproteine des MV. Es handelt sich dabei um ein peripheres Membranprotein, das in infizierten Zellen bzw. im Viruspartikel mit dem zytoplasmatischen Teil der Glykoproteine interagiert (Moll et al, 2002; Runkler et al, 2007). Zusätzlich bindet es über das N-Protein auch an den RNP, wodurch es negativ regulierend auf die virale Polymeraseaktivität wirkt. Dem

M-Protein wird, aufgrund seiner Fähigkeit, auch ohne die anderen viralen Proteine virusähnliche Partikel zu produzieren, große Bedeutung bei der Verpackung und Knospung neuer Viruspartikel zugeschrieben (Pohl et al, 2007; Salditt et al, 2010).

F-Protein

Das Fusionsprotein ist ein Typ-I-Transmembranprotein und wird zunächst in seiner inaktiven Form F_0 (60 kDa) exprimiert. Im Golgi-Apparat wird es proteolytisch in die zwei Untereinheiten, F_1 (41 kDa) und F_2 (22 kDa) prozessiert, die über eine Disulfidbrücke als Heterodimer die aktive Form des F-Proteins darstellen (Bolt et al, 1999). Auf der Zell- bzw. Partikeloberfläche bilden F-Proteine Trimere aus (Wild et al, 1994), die jeweils mit einem Tetramer des H-Proteins funktionelle Einheiten bilden. Die Aufgabe des F-Proteins ist die Vermittlung der Fusion zwischen der Virushülle und der Zellmembran. Hierbei handelt es sich um einen pH-unabhängigen Fusionsprozess, der einer vorherigen Bindung des H-Proteins an einen zellulären Rezeptor bedarf (Navaratnarajah et al, 2009).

H-Protein

Das Hämagglutinin ist ein 80 kDa großes Typ-II-Transmembranprotein, das die Bindung an den zellulären Rezeptor vermittelt. H-Proteine bilden über eine Disulfidbrücke Homodimere aus, von denen je zwei auf der Virus- bzw. Zelloberfläche als H-Proteintetramer mit einem F-Proteintrimer eine funktionelle Einheit bilden (Devaux et al, 1996; Plemper et al, 2000; Yanagi et al, 2006). Als zelluläre Rezeptoren wurden bisher die zwei Transmembranproteine CD150 und CD46 identifiziert. Die Expression von CD150, auch SLAM (*signaling lymphocyte activation molecule*) genannt, wurde bisher nur für hämatopoetische Zellen beschrieben. Es wird unter anderem auf der Oberfläche von B-Zellen, aktivierten T-Zellen, Gedächtniszellen, dendritischen Zellen und Monozyten auf der Oberfläche exprimiert und von allen MV-Stämmen als Rezeptor benutzt (Yanagi et al, 2006). Im Gegensatz dazu wird CD46 von allen humanen, kernhaltigen Zellen exprimiert (Liszewski et al, 1991) und dient attenuierten MV-Stämmen *in vitro* zusätzlich als Rezeptor (Yanagi et al, 2006). Studien an infizierten Makaken legen jedoch nahe, dass selbst attenuierte Stämme *in vivo* ausschließlich CD150 benutzen, da nur maserninfizierte Zellen detektiert werden konnten, die auch CD150-positiv waren (de

Vries et al, 2010). Die Bindung an diese beiden Rezeptoren wird von unterschiedlichen Domänen des H-Proteins vermittelt, wobei nicht auszuschließen ist, dass diese überlappen. Nach der Bindung eines der beiden Rezeptoren kommt es zur Konformationsänderung des H-Proteins, was essentiell für die Initiation der Fusion durch das F-Protein ist (Hashiguchi et al, 2011; Santiago et al, 2010).

1.1.3 Replikationszyklus

Durch die H-Protein-vermittelte Anbindung an den zellulären Rezeptor und die dadurch initiierte F-Protein-vermittelte Fusion der Virusmembran mit der Zellmembran gelangt der RNP ins Zytoplasma (Navaratnarajah et al, 2009). Hier wird die Transkription des N-Gens durch die Bindung der im Partikel enthaltenen Polymerasekomplexe an die 3'-*leader*-Sequenz initiiert (Crowley et al, 1988). Das fertige Transkript erhält eine 5'-cap-Struktur und wird polyadenyliert. Der Polymerasekomplex dissoziiert nun entweder an der IGS zwischen N- und P-Gen von der RNA oder aber überliert die IGS und beginnt mit der Transkription des P-Gens. Dissoziierte Polymerasekomplexe binden erneut an der 3'-*leader*-Sequenz, von wo aus sie erneut mit der Transkription des N-Gens beginnen. Die Möglichkeit der Dissoziation besteht bei jeder IGS und die Wahrscheinlichkeit dazu nimmt mit der Entfernung der IGS zur 3'-*leader*-Sequenz zu. Dadurch entsteht ein Transkriptionsgradient auf mRNA-Ebene, der dazu führt, dass die Menge an gebildetem Protein von der Lage seines Gens im Genom abhängt (Cattaneo et al, 1987a; Schneider-Schaulies et al, 1989). Nach Erreichen einer kritischen Masse an überschüssigem N-Protein lagert sich dieses an entstehende Transkripte an und verhindert dadurch das Dissoziieren des Polymerasekomplexes an den IGS. Dadurch kommt es zur Bildung von Genomen positiver Polarität, so genannten Antigenomen (Banerjee, 1987; Blumberg & Kolakofsky, 1981; Lamb, 1996; Rima & Duprex, 2005). Diese besitzen einen starken Promotor an ihrem 3'-Ende und bilden im Folgenden die Matrize zur Herstellung neuer viraler Genome durch den viralen Polymerasekomplex. Die Entstehung viraler Genome ist strikt an die Komplexierung mit N-Proteinen gekoppelt, über deren Bindung an das P-Protein und darüber auch an das L-Protein es zur Bildung von neuen RNPs kommt (Rima & Duprex, 2005). Die RNPs werden über einen im Detail noch nicht verstandenen Mechanismus an die Plasmamembran transloziert, wo die Knospung neuer Partikel stattfindet. Die

Translation der viralen mRNA wird von der zellulären Maschinerie übernommen. Die beiden Glykoproteine H und F werden über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat in der Plasmamembran eingelagert. Die an freien Ribosomen gebildeten M-Proteine lagern sich an der Innenseite der Plasmamembran an, wo sie einerseits mit den Glykoproteinen und andererseits mit den RNPs interagieren. Sobald alle Bestandteile eines Viruspartikels an der Plasmamembran lokalisieren, kann ein neugebildetes Viruspartikel durch Abschnürung von der Plasmamembran, auch *budding* genannt, entstehen.

Durch diesen Vorgang, der bevorzugt an bestimmten Membranmikrodomänen, den *lipid rafts*, stattfindet, erhält das Virus seine von der Zellmembran abgeleitete Hülle (Manie et al, 2000; Vincent et al, 2000). MV, besonders Isolate aus Patienten mit akuten Masern, infizieren Zielzellen in Kultur in der Regel stets lytisch. Eine persistierende Infektion kann jedoch durch mehrfaches Passagieren auch in Zellkultur herbeigeführt werden (Rima & Duprex, 2005).

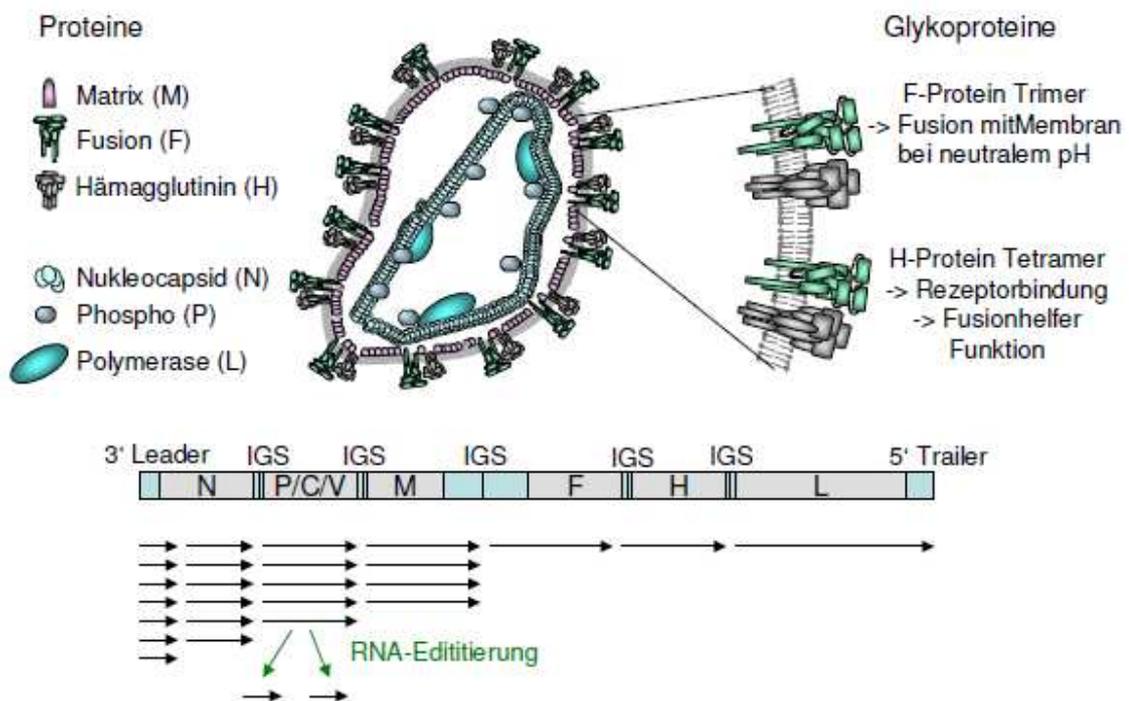


Abb. 1.2: Schematische Darstellung eines Masernvirus und der Genomorganisation

1.2 Epidemiologie und Pathogenese

Die Masern treten, trotz eines verfügbaren Impfstoffs, der eine lebenslange Immunität gewährt, immer noch weltweit auf. Zwar treten auch in industrialisierten Ländern, begünstigt durch eine unzureichende Impfrate in der Bevölkerung, immer wieder Masernepidemien auf, jedoch erkrankt der Großteil der Kinder aufgrund mangelnden Zugangs zum Impfstoff in weniger industrialisierten Ländern mit schlechter medizinischer Infrastruktur. Während in Industrienationen nur ca. 10% der Masernfälle mit Komplikationen einhergehen, treten in weniger entwickelten Ländern Komplikationen in ca. 80% der Fälle (Clements & Cutts, 1995). Hier zählt die Masernerkrankung immer noch zu einer der häufigsten Todesursachen bei Kindern unter 5 Jahren. 2008 kam es laut WHO weltweit zu geschätzten 164000 Todesfällen durch Masern. Da MV den Menschen als einzigen Wirt infiziert und es darüber hinaus nur einen Serotypen gibt, besteht die Möglichkeit, und dies ist auch das erklärte Ziel der WHO, die Masern durch Impfung weltweit auszurotten. Damit ein Schutz vor dem Ausbruch von Epidemien besteht und sich somit das Virus, vor allem wenn es von außen eingeschleust wurde, nicht ausbreiten kann, bedarf es einer Durchimpfungsrate in der Bevölkerung von 95 % (Griffin et al, 2008). Der Impfstoff gegen Masern, der in zwei Impfdosen verabreicht wird, besteht aus einem attenuierten MV-Stamm. Die erste Dosis sollte laut ständiger Impfkommision (STIKO) ab dem 12. Lebensmonat verabreicht werden und die zweite, die zur Schließung von Impfücken dient, zwischen dem 15.-23. Monat. Während ein Durchimpfen der Bevölkerung in weniger entwickelten Ländern hauptsächlich aus finanziellen und infrastrukturellen Gründen scheitert, ist es in Industrienationen zum Großteil auf Impfverweigerung zurückzuführen. Auch die Durchimpfungsrate in Deutschland verfehlt die 95 %-Marke, sodass es immer wieder zu Epidemien kommt. In Bayern ergab eine Erhebung zur Durchimpfungsrate bei der Schuleingangsuntersung 2007/08, dass nur 75,7 % aller untersuchten Kinder mit zwei Dosen geimpft wurden (Hölscher, 2009).

Nichtgeimpfte Personen infizieren sich über Tröpfcheninfektion, wobei das Virus zunächst Zellen im oberen Bereich des respiratorischen Trakts infiziert (Riley et al, 1978). Hierbei handelt es sich um CD11c⁺-Zellen, also entweder um Monozyten oder dendritische Zellen (Lemon et al, 2011). Das Virus infiziert seinem Tropismus

entsprechend demnach zunächst CD150⁺-Zellen. Über die infizierten Leukozyten gelangt das Virus zunächst in die angrenzenden Lymphknoten, wo es Lymphozyten infiziert, über die das Virus dann in alle lymphatische Gewebe und Organe gelangt. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass in einzelnen lymphatischen Organen bis zu 30 % der Lymphozyten infiziert waren (de Swart et al, 2007). Anschließend disseminiert das Virus zellassoziiert, was eine systemische Infektion zur Folge hat, wodurch letztlich auch CD150⁻-Zellen in der Haut, im Darmepithel, in der Leber und weiteren Organen infiziert werden (Herndon & Rubinstein, 1968; Kimura et al, 1975; McChesney et al, 1997; Sakaguchi et al, 1986). Durch die Infektion wird eine spezifische Immunantwort ausgelöst, die letztlich das Virus im Körper eliminiert und im Anschluss an die Masern eine lebenslange Immunität gewährt.

In seltenen Fällen verläuft eine MV-Infektion asymptomatisch (Sonoda & Nakayama, 2001), doch in der Regel treten erste Symptome nach einer 9- bis 11-tägigen Inkubationszeit auf. Dabei handelt es sich um Fieber, Husten, Schnupfen und Bindehautentzündung. Zu diesem Zeitpunkt kommt es zur Ausbildung der Koplikschen Flecken, einem Exanthem auf der Mundschleimhaut. Der für die Masern typische makulopapuläre Hautausschlag (Masernexanthem) setzt einige Tage später ein. Er beginnt hinter den Ohren und setzt sich über die Gesichtshaut fort, bis der ganze Körper bedeckt ist. Bei dem Hautausschlag, der 5 bis 6 Tage andauert, handelt es sich um die Immunreaktion auf die nun auch die Haut befallende Infektion. Neben diesen Symptomen kann es zu Komplikationen kommen, die meist durch die maserninduzierte generelle Immunsuppression und damit einhergehende opportunistische Infektionen bedingt sind. Die häufigsten Komplikationen sind Diarrhöe, Mittelohrentzündungen und Pneumonien. Desweiteren kommt es in seltenen Fällen zu neurologischen Komplikationen. Während der akuten Masern kann es in 0,1 % der Fälle zur akuten postinfektiösen Masernenzephalitis kommen (APME). Diese Enzephalitis ist nicht direkt auf eine Maserninfektion des Gehirns zurück zu führen. Wahrscheinlich führt eine maserninduzierte, pathologische Immunreaktion im Gehirn zu dieser in 20 % der Fälle tödlich verlaufenden Komplikation. Erst später, nach den überstandenen akuten Masern, kann es zu zwei weiteren Komplikationen kommen, der Masern-Einschlußkörper-Enzephalitis (MIBE) und der subakuten sklerosierenden Panenzephalitis (SSPE). Beide Komplikationen

gehen auf eine Infektion des Gehirns mit MV zurück. Während MIBE ausschließlich bei immungeschwächten Patienten auftritt und somit eher eine Komplikation der Immunschwäche ist, handelt es sich bei der SSPE um eine Spätfolge der Masern bei Patienten mit einer normalen Immunantwort auf die akuten Masern (Reuter & Schneider-Schaulies, 2010).

1.2.1 Subakute sklerosierende Panenzephalitis (SSPE)

Die wohl schwerwiegendste Komplikation der Masern, SSPE, tritt im Mittel 8 Jahre nach den akuten Masern auf, wobei die frühesten Fälle bereits nach 9 Monaten und der späteste Fall nach ca. 30 Jahren beobachtet wurden. Neuere Daten geben die Häufigkeit einer SSPE mit 1 pro 10000 Masernfälle an. Die symptomatische Phase kann bis zu vier Jahre andauern und verläuft immer letal. Da die meisten Fälle im Alter zwischen 8 und 11 Jahren auftreten, gehören zu den ersten Symptomen einer SSPE eine Verschlechterung der schulischen Leistungen, die mit anormalen Verhaltensänderungen und intellektuellen Beeinträchtigungen einhergeht. Darauf folgt eine dauerhafter Verschlechterung der Motorik, Schüttelkrämpfe, Starre, Demenz, eine Beeinträchtigung der Sehkraft und letztlich der Tod (Gutierrez et al, 2010). Bei der SSPE handelt es sich um eine persistierende MV-Infektion des Gehirns, die sich in einer starken Demyelinierung und Infektion von Neuronen manifestiert (Rima & Duprex, 2005). SSPE wurde in allen untersuchten Fällen vom Wildtypvirus verursacht, das zur Zeit der Primärinfektion des Patienten zirkulierte. Attenuierte MV-Stämme, die zur Impfung benutzt werden, verursachen weder eine Immunsuppression noch SSPE. Im Gegenteil, die Inzidenz von SSPE ist seit Beginn der Impfung stark rückläufig. MV, das aus SSPE-Patienten isoliert wurde, ist gegenüber Isolaten während der akuten Masern stark verändert. Im Gehirn werden keine neuen, infektiösen, freien Viruspartikel mehr gebildet, was auf Hypermutation des viralen Genoms und dabei besonders auf Veränderungen im zytoplasmatischen Teil des F-Proteins und des M-Proteins zurückgeführt wird (Baczko et al, 1986; Cattaneo et al, 1988). Dem F-Protein fehlt ein carboxyterminales Pentadecapeptid, eine in allen Morbilliviren hochkonservierte Struktur, die mit der Fähigkeit zur Interaktion mit dem M-Protein und der Lokalisation des F-Proteins in *lipid rafts* in Verbindung gebracht wird. Das Fehlen des Pentadecapeptids geht auf Mutationen zurück, die ein Stopkodon in das Leseraster einfügen bzw. dieses verschieben,

wodurch ein C-terminal verkürztes F-Protein entsteht (Watanabe et al, 1995). Das M-Gen ist hypermutiert, was zur Beeinträchtigung der Funktion des Startkodons und der Stabilität des Proteins sowie zu gesteigerter proteolytischer Degradation führt (Cattaneo et al, 1988). Ein weiterer transkriptioneller Unterschied zwischen MV-Isolaten aus Patienten mit akuten Masern und SSPE ist der stärkere Transkriptionsgradient, der dazu führt, dass bei einer SSPE kaum F- und H-mRNA gebildet wird (Cattaneo et al, 1987a).

Ein Risikofaktor für eine SSPE ist eine Erkrankung an Masern vor dem 2 Lebensjahr. Weiterhin wird eine genetische Disposition, nämlich Punktmutationen in immunologisch wichtigen Molekülen wie z.B. IL-2, IL-4, IL-12, MxA, und TLR-3 (Inoue et al, 2002; Ishizaki et al, 2008; Pipo-Deveza et al, 2006; Torisu et al, 2004; Yilmaz et al, 2007) diskutiert.

Bei SSPE-Isolaten konnte gezeigt werden, dass die Ausbreitung zwischen Neuronen ausschließlich an Synapsen stattfindet. Diese Ausbreitung im Gehirn verläuft unabhängig von den beiden Rezeptoren CD150 und CD46. CD150 wird von Neuronen gar nicht und CD46 nur in geringem Maße exprimiert (McQuaid & Cosby, 2002). Es gibt zwar einige Ansätze, die Persistenz und die Ausbreitung des MV im zentralen Nervensystem (ZNS) zu verstehen, doch gibt es immer noch keine genaue Vorstellung davon, über welchen Pfad das MV ins Gehirn gelangt (Reuter & Schneider-Schaulies, 2010).

1.2.2 MV-induzierte Immunsuppression

Während die neuronalen Komplikationen direkt auf die MV-Infektion zurückzuführen sind, handelt es sich bei den meisten anderen Komplikationen um opportunistische Infektionen, die durch die MV-induzierte Immunsuppression bedingt sind. Die Primärinfektion mit MV geht einher mit einem immunologischen Paradox. Sie hat die Aktivierung einer spezifischen Immunantwort zur Folge, die das Virus rasch im Körper eliminiert und zu einer langfristigen, wenn nicht lebenslangen, Immunität gegen MV führt, aber zeitgleich auch eine generelle Immunsuppression verursacht (Avota et al, 2010). Diese kann zwischen einigen Wochen und, in extremen Fällen, einigen Monaten andauern. Die Erstbeschreibung der MV-induzierten Immunsuppression geht auf von Pirquet (1908) zurück, der beschrieb, dass bei Patienten

mit akuten oder kurz zuvor überstandenen Masern eine Reaktion auf den kutanen Tuberkulintest ausblieb. Kennzeichnend für die MV-induzierte Immunsuppression sind ein Zytokinungleichgewicht, der Verlust der Expansionsfähigkeit von T-Zellen nach mitogener oder zellulärer Stimulation *ex vivo* und eine Leukopenie in der Peripherie.

Mit dem Einsetzen des Masernexanthems und damit der Eliminierung des Erregers kommt es zur Veränderung der Plasmaspiegel einiger Zytokine, die auch noch nach dem Verschwinden des Virus Bestand hat. So ist der IL-2-Spiegel im Plasma über 2 Wochen, die Spiegel löslichen CD4 und IL-4 auch noch nach 4 Wochen erhöht. Dazu kommt, dass mononukleäre Zellen aus Patienten, die das Masernexanthem überstanden haben, *ex vivo* nach Stimulation mit anti-CD3-Antikörpern signifikant mehr IL-4 und IL-6 sezernieren, aber dafür die übliche Interferon- γ -Produktion ausbleibt. Diese Beobachtung geht einher mit einer Verschiebung der Immunantwort in Richtung Th2 und einer andauernden reduzierten zellulären Immunantwort (Griffin & Ward, 1993).

Die Proliferationsfähigkeit von T-Zellen aus Masernpatienten ist *ex vivo* nachhaltig gestört. Sie verlieren sowohl ihre Eigenschaft nach mitogener Stimulation *ex vivo* zu proliferieren, als auch nach Stimulation durch antigenpräsentierende Zellen in einer gemischten Leukozytenreaktion (MLR) (Schneider-Schaulies & Dittmer, 2006; Schneider-Schaulies et al, 2001). Ein Grund für die inhibierte Proliferation der T-Zellen könnte die beobachtete Blockierung des Phosphoinositid 3 Kinase (PI3K)/AKT-Signalwegs sein, dessen Einfluss die Zelle normalerweise in den Zellzyklus eintreten lässt (Avota et al, 2001; Avota et al, 2004). Darüber hinaus induziert MV die Bildung einer *splice*-Variante der Phosphatase SHIP (SIP110), die durch die Phosphorylierung von Phosphatidylinositolphosphaten, vor allem PIP3, ebenfalls die PI3K/AKT-Signalkaskade unterbinden (Avota et al, 2006). Interessanterweise bedarf es weder einer Infektion mit MV noch der Anwesenheit der beiden bekannten Rezeptoren CD150 und CD46 auf den Zellen, um einen Proliferationsarrest zu induzieren. Der Kontakt des viralen Glykoproteinkomplex, jedoch nicht des H- oder F-Proteins alleine, ist ausreichend (Schlender et al, 1996). MV führt einen Arrest der T-Zellproliferation nicht nur über den direkten Einfluss auf die Lymphozyten herbei, sondern auch über dendritische Zellen (DC). Zwar ist ein

direkter Effekt der MV-Infektion auf DC, zumindest bezüglich ihrer Reifung, Polarisation und Migration, nicht gegeben, jedoch sind infizierte DC nicht mehr in der Lage längere Konjugate mit T-Zellen zu bilden, wodurch diese nicht ausreichend aktiviert werden können (Schneider-Schaulies et al, 2003).

Die MV-induzierte Leukopenie betrifft unter anderem Lymphozyten, wobei ihr Verlust im peripheren Blut während der akuten Masern eintritt (Hoffman et al, 2003; Kim et al, 2002; Okada et al, 2001). Während sich die Anzahl an CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen nach einigen Tagen wieder normalisiert, kann die Lymphopenie bezüglich B-Zellen einige Wochen andauern (Okada et al, 2001; Ryon et al, 2002). Die Ursachen für die Lymphopenie sind bis dato nicht geklärt. Ein MV-vermittelter Verlust durch Zelltod scheint zumindest im peripheren Blut ausgeschlossen, da hier kaum mehr als 2 % der Lymphozyten infiziert sind. Studien mit infizierten Makaken zeigen zwar, dass der Prozentsatz an infizierten Lymphozyten in verschiedenen lymphatischen Organen bis zu 30 % betragen kann, doch wurde noch nicht untersucht, ob es hier zum vermehrten Zelltod kommt (de Swart et al, 2007). Hinweise auf eine gestörte Hämatopoese bzw. Beeinträchtigung von hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark konnten in der bisher einzigen Studie zu diesem Thema nicht erbracht werden (Manchester et al, 2002). Bei dieser *in vitro*-Studie konnte lediglich ein lytischer Effekt eines dualtropen MV-Stamms auf Stromazellen beobachtet werden, der nach Kokultivierung mit hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen deren Fähigkeit zur Koloniebildung beeinträchtigte. Eine Untersuchung der Interaktion eines strikt CD150-tropen MV mit Knochenmarkszellen gab es bisher nicht.

1.3 Knochenmarkszellen

Das hämatopoetische System der Säugetiere setzt sich aus über einem Dutzend verschiedener differenzierter Zellen, wie den Lymphozyten, den Granulozyten, Erythrozyten, dendritischen Zellen, Thrombozyten und weiteren, zusammen. Die Lebensspanne der einzelnen Zelltypen reicht dabei von wenigen Stunden, wie im Fall der Neutrophilen, über durchschnittlich 120 Tage bei Erythrozyten bis hin zu Lymphozyten, die Gedächtniszellen hervorbringen, deren Lebensdauer nicht von vornherein beschränkt ist (Dingli & Pacheco, 2010). Die eingeschränkte Lebensdauer der meisten ausdifferenzierten Blutzellen macht einen ständigen Nachschub an

neuen Zellen erforderlich, um das System aufrecht zu erhalten. Der mit dem Begriff Hämatopoese beschriebene Mechanismus der Blutbildung bringt im Menschen täglich $3,5 \times 10^{11}$ neue Blutzellen hervor (Dingli & Pacheco, 2010). Der Ursprung all dieser Zellen lässt sich auf einige wenige hämatopoetische Stammzellen (*hematopoietic stem cell*, HSC) zurückführen, die im Knochenmark residieren. Es wird vermutet, dass bei allen Säugetieren die Anzahl aller HSC ungefähr zwischen 11000 und 22000 liegt (Abkowitz et al, 2002; Gordon et al, 2002; McCarthy, 2003). Diese finden im adulten Knochenmark ihre Nische, wo ein Teil als ruhende Stammzellen vorliegt und der andere Teil als aktive Stammzellen proliferiert und die Hämatopoese aufrecht erhält. Die Nische der HSC im Knochenmark wird von mesenchymalen Stromazellen (MSC), Endothelzellen und Zellen des Sympathikus gebildet. Diese bilden durch den direkten Zell-Zell-Kontakt mit HSC und durch die Ausschüttung von Zytokinen eine Umwelt, in der die HSC ihren undifferenzierten Status erhalten können, aus der sie aber auch die Hämatopoese starten können (Askmyr et al, 2011).

1.3.1 Zellen der hämatopoetische Stammzellnische

Bereits vor über 40 Jahren wurde postuliert, dass im Knochenmark Mikrodomänen bestehen, in denen Bedingungen herrschen, die die Hämatopoese ermöglichen (Trentin, 1971; Wolf & Trentin, 1968). Auch wenn das System der hämatopoetischen Stammzellnische heute noch nicht vollständig verstanden ist, so weiß man doch, dass HSC im Knochenmark residieren und dort die Hämatopoese ihren Anfang nimmt. Der Kontakt zu Knochenmarkszellen, aber auch sezernierte Zytokine, sind hierbei essentiell für die Fähigkeit der HSC zur Selbsterneuerung. Diese ist das entscheidende Kriterium für die Definition der Stammzellnische, da Stammzellen außerhalb einer solchen Umwelt diese Fähigkeit verlieren (Seita & Weissman, 2010). Die Nische wird von neuronalen, endothelialen und mesenchymalen Zellen gebildet. Das sympathische Nervensystem innerviert das Knochenmark und beeinflusst die Mobilisierung, die Proliferation und die Differenzierung der HSC über Neurotransmitter bzw. indirekt über die Beeinflussung mesenchymaler Zellen. Endothelzellen, die die Blutgefäße auskleiden, bilden die vaskuläre Nische, wo vor allem aktivierte HSC residieren. Die Rolle als Nischenzellen wird den Endothelzellen hauptsächlich aufgrund ihrer Fähigkeit, HSC *in vitro* zu unterstützen, zugeschrieben.

Desweiteren befindet sich die hämatopoetische Nische während der Embryogenese in Organen, in denen Endothel- aber keine mesenchymalen Zellen vorkommen (Askmyr et al, 2011; Tavian et al, 2010). Der Großteil der HSC ruht in der endostealen Nische, die von Zellen mesenchymalen Ursprungs gebildet wird (Arai & Suda, 2007; Askmyr et al, 2011; Carlesso & Cardoso, 2010; Purton & Scadden, 2008). Diese Zellen werden *ex vivo* in Kokulturen benutzt, um für HSC möglichst nischenähnliche Bedingungen zu schaffen. Dabei werden hämatopoetische Stamm-/Vorläuferzellen (hematopoietic stem/progenitor cells, HS/PC) *in vitro* aber nicht mit einem bestimmten mesenchymalen Zelltypen kokultiviert, sondern mit sogenannten mesenchymalen Stromazellen (MSC). Der Begriff MSC beschreibt dabei vielmehr die *ex vivo* kultivierten Zellen als die Zellen *in vivo* im Knochenmark. MSC sind eine sehr heterogene Zellpopulation aus mesenchymalen Stamm- und Vorläuferzellen und ausdifferenzierten, fibroblastenähnlichen Stromazellen. Da keine spezifischen Marker zur Verfügung stehen, um MSC von anderen Zellen zu unterscheiden, wurden von der internationalen Gesellschaft für Zelltherapie drei Kriterien aufgestellt, die Zellen erfüllen müssen, um als MSC zu gelten (Dominici et al, 2006):

- Adhärenz an Plastikoberflächen
- durchflusszytometrische Detektion von CD73, CD90, CD105 bei gleichzeitiger Abwesenheit von CD34, CD45, HLS-DR, CD14 oder CD11b und CD79a oder CD19
- Fähigkeit *in vitro* zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten zu differenzieren

Mit Hilfe der MSC kann die Stammzellnische *in vitro* imitiert und HSC längerfristig kultiviert werden, ohne dass sie differenzieren und ihre Selbsterneuerungseigenschaft einbüßen. Ursprünglich wurden MSC aus dem Knochenmark isoliert, jedoch konnten mittlerweile aus vielen anderen Organen MSC isoliert werden, die in ihren Eigenschaften den Knochenmarks-MSC zwar sehr ähnlich, aber nicht identisch sind (Kern et al, 2006). Da *in vivo* die humane Hämatopoese jedoch ausschließlich im Knochenmark stattfindet, wurden in der vorliegenden Arbeit nur aus Knochenmark isolierte MSC eingesetzt. So beschreiben die im folgenden

benutzten Begriffe ‚Knochenmarksstromazellen‘ und ‚Stromazellen‘ immer Knochenmarks-MSK.

1.3.2 Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen

Das hämatopoetische System wird meistens hierarchisch gegliedert dargestellt, wobei die HSC an oberster Stelle steht und nach unten hin erst die verschiedenen Vorläuferzellen und zum Schluss die ausdifferenzierten Blutzellen folgen. Diese Darstellungsweise spiegelt nicht nur die einzelnen Entwicklungsstufen einer Zelle während der Hämatopoese wieder, sondern auch das unterschiedliche Differenzierungspotential während der verschiedenen Entwicklungsstufen. Die pluripotente HSC kennzeichnet zum einen die Fähigkeit, durch Differenzierung alle Blutzellen hervorzubringen, und zum anderen durch Zellteilung neue Stammzellen hervorzubringen. Durch ein Gleichgewicht zwischen Differenzierung und Selbsterneuerung wird sowohl der Bedarf an neuen Blutzellen bedient als auch die Population der Stammzellen aufrecht erhalten. Weiter differenzierte Tochterzellen der HSC sind die multipotenten HPC. Diese haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung verloren, bringen jedoch noch Zellen aller Blutlinien hervor. Nach weiterer Differenzierung beschränkt sich das Potential der nun entstandenen oligopotenten HPC darauf, nur noch Zellen der myeloiden oder der lymphoiden Linie bilden zu können. Darauf folgt die Entwicklung in linienspezifische Vorläuferzellen und schließlich in reife Zellen der unterschiedlichen Blutlinien (Abb.: 1.3) (Coskun & Hirschi, 2010; Seita & Weissman, 2010). Die Identifizierung von HS/PC erfolgt entweder über durchflusszytometrische Phänotypisierung oder über den *in vivo*- bzw. *in vitro*-Nachweis ihres Differenzierungspotentials. Der wissenschaftliche Goldstandard für den Nachweis von HSC bzw. HPC ist die Fähigkeit der Zellen, immunsupprimierte, bestrahlte Mäuse zu rekonstituieren. Transplantiert man HPC in diese Mäuse, sind sie in der Lage, kurzzeitig das hämatopoetische System wieder herzustellen. Dabei können multipotente HPC alle und oligopotente HPC nur einzelne Kompartimente des Bluts rekonstituieren. Eine über die gesamte Lebensspanne der Maus andauernde und vollständige Rekonstitution ist jedoch nur mit HSC möglich (Bonnet, 2003). Der Nachteil der *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen ist, dass sie nur retrospektive Aussagen zulassen und die HS/PC danach nicht mehr zur Verfügung stehen. Aufgrund dessen wird versucht, die HS/PC

anhand ihrer Oberflächenmoleküle durchflusszytometrisch zu identifizieren. In der Literatur wird eine ganze Reihe von Markern diskutiert, jedoch ist ein spezifischer Stammzell- oder Vorläufermarker nicht bekannt. Über eine Kombination verschiedener Marker können jedoch HS/PC-enthaltende Populationen eingegrenzt werden. Die wichtigsten und etabliertesten drei Marker auf humanen Zellen sind hierbei CD34, CD133 und CD38 (Andrews et al, 1986; Civin et al, 1984; Miraglia et al, 1997; Novelli et al, 1998; Yin et al, 1997). Innerhalb der CD45⁺-Blutzellen unterscheiden sich HS/PC von den linienspezifischen Zellen durch die Expression von CD34 bzw. CD133. Beide Marker werden deswegen auch zur Isolation von HS/PC benutzt. Innerhalb der HS/PC-Population können darüber hinaus mit Hilfe des Markers CD38 noch zwei Populationen voneinander unterscheiden. CD38⁺-Zellen stellen alle HPC dar, in der CD38⁻-Subpopulation hingegen kommen HSC 1000-fach angereichert vor (Novelli et al, 1998; Xiao & Dooley, 2000). Da im murinen hämatopoetischen System die beiden Marker CD34 und CD133 HS/PC nicht verlässlich markieren, muss bei der Identifizierung das Fehlen von linienspezifischen Markern (Lin), wie z.B. CD3 als T-Zellmarker, berücksichtigt werden. In der Regel werden murine HS/PC über die Expression von c-KIT und Sca1 und gleichzeitigem Fehlen von Lin identifiziert (KSL-Zellen). Im Jahre 2005 wurde die Entdeckung eines Expressionsmusters publiziert, das es erlaubt, KSL-Zellen mit Hilfe der drei SLAM-Familienmitglieder CD150, CD244 und CD48 als HSC, multipotente HPC oder oligopotente HPC zu identifizieren. Innerhalb der KSL-Zellen exprimieren HSC exklusiv CD150, wohingegen multipotente HPC nur CD244 und oligopotente HPC sowohl CD244 als auch CD48 exprimieren (Kiel et al, 2005). Mit Hilfe dieses, als *SLAM-code* bezeichneten, Expressionsmusters können murine HSC viel reiner isoliert werden.

1.3.1 Leukämische Stamm-/Vorläuferzellen

Leukämien sind maligne Störungen, die durch die Vermehrung entarteter, nicht ausdifferenzierter Blutzellen, sogenannter Blasten, gekennzeichnet sind. Nachdem vor fast 20 Jahren festgestellt wurde, dass 99 % der Blasten einiger akuter myeloider Leukämien (AML) nicht proliferieren, dafür aber ein winziger Prozentsatz der AML-Zellen in xenotransplantierten Mäusen eine AML etablieren kann, kam das erste Mal die Vermutung auf, dass Leukämien ähnlich dem Blut auch einen hierarchischen

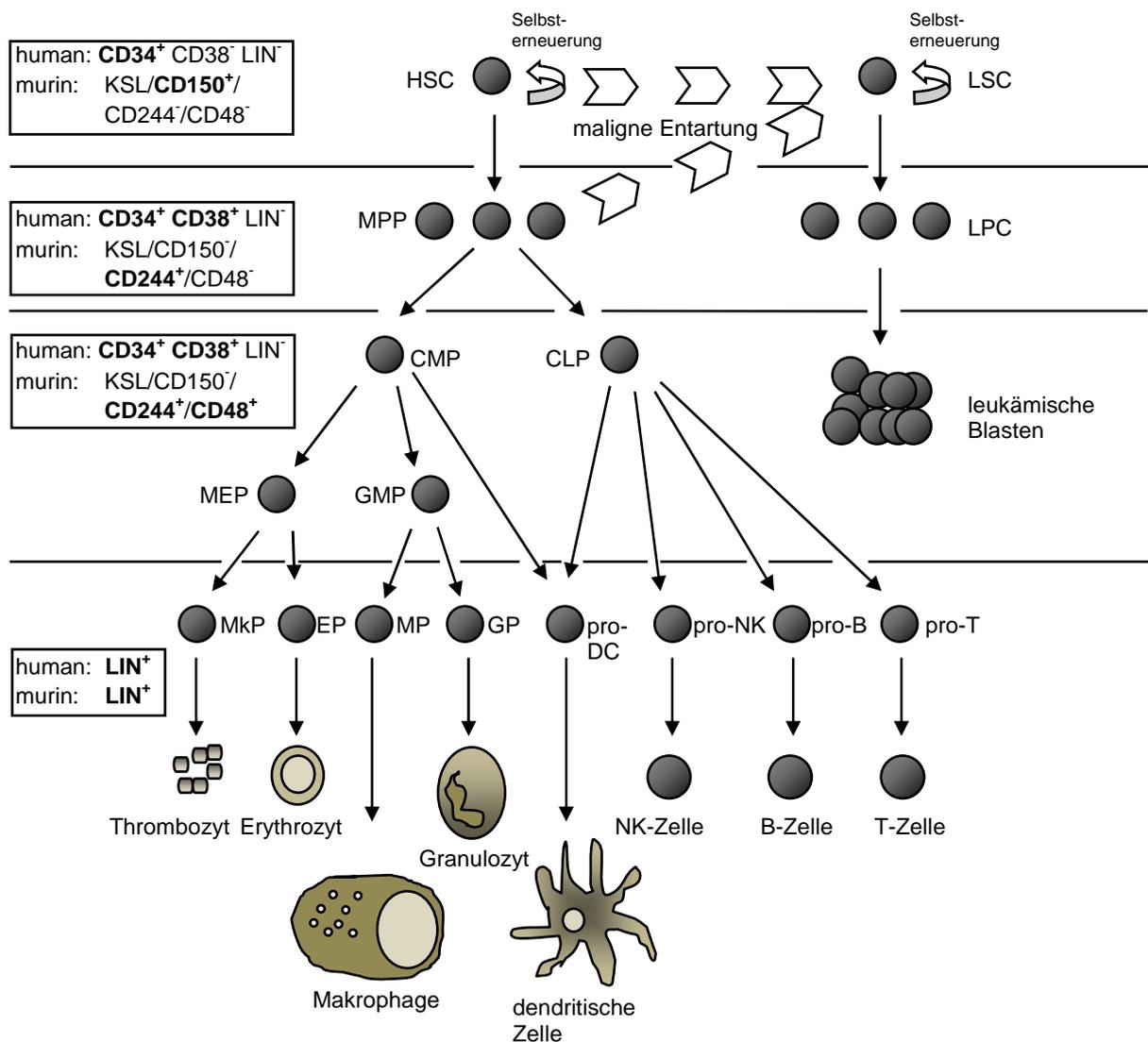


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der hämatopoetischen Hierarchie

Ausgehend von der HSC verläuft die Entwicklung aller differenzierten, hämatopoetischen Zellen über verschiedene Entwicklungsstufen, den Vorläuferzellen (*progenitor cells*, PC). Anhängig vom Differenzierungsstadium weisen die Zellen unterschiedliche Expressionsmuster von Oberflächenmarkern auf. Humane Zellen werden anhand der CD34/CD38/LIN-Expression phänotypisiert und murine Zellen mittels c-Kit/Sca-1/LIN-Expression (KSL) in Kombination mit dem SLAM-code. HSC, hämatopoetische Stammzelle; LSC, leukämische Stammzelle; MPP, multipotente Vorläuferzelle; LPC, leukämische Vorläuferzelle; CMP, myeloide Vorläuferzelle (*common myeloid progenitor*); CLP, lymphoide Vorläuferzelle (*common lymphoid progenitor*); MEP, Megakaryozyt/Erythrozyt Vorläuferzelle; GMP, Granulozyt/Makrophage Vorläuferzelle; Mkp, Megakaryozytvorläufer; EP, Erythrozytenvorläufer; MP, Makrophagenvorläufer; GP, Granulozytenvorläufer; NK, natürliche Killerzelle; LIN, Linienmarker

Aufbau aufweisen (Ailles et al, 1999; Bonnet & Dick, 1997; Lapidot et al, 1994). Im Falle von Leukämien werden zwei Wege postuliert, die zur Entstehung einer LSC führen. Zum einen geht man von einer malignen Entartung einer HSC aus, zum anderen von der Entartung einer HPC, die dadurch das Selbsterneuerungspotential zurückgewinnt (Testa, 2011). Die oftmals chemotherapie- und strahlenresistente Krebsstammzelle wird als Ursache für das erneute Auftreten der Krankheit nach erfolgreicher Behandlung angesehen und rückt immer mehr in den Fokus für neue Therapien. Deswegen wird eine genaue Charakterisierung der LSC, aber auch anderer Krebsstammzellen, angestrebt. Die LSC vieler Blutkrebsarten besitzen den gleichen CD34/CD38-Phänotypen wie gesunde HS/PC. Ein Großteil der AML, aber auch das myelodysplastische Syndrom, verschiedene akute lymphoblastische Leukämien, chronische myeloide Leukämien und myeloproliferative Erkrankungen entstehen aus CD34⁺/CD38⁻-LSC (Testa, 2011). Die weitere Entwicklung gleicht dann wahrscheinlich der des Blutes, d.h. dass die LSC eine leukämische Vorläuferzelle (LPC) hervorbringt, aus der wiederum die Blasten entstehen (Abb.: 1.3).

1.4 Ziel der Arbeit

Da die MV-induzierte Immunsuppression von einer Leukopenie im peripheren Blut begleitet wird, wurde bereits in einer vorherigen Studie die Frage adressiert, ob das MV mit Knochenmarkszellen interagiert. Der Hypothese einer möglichen Knochenmarkssuppression durch MV liegen zwei verschiedene Beobachtungen zu Grunde. Zum einen belegen zahlreiche Studien, dass MV zumindest bei Lymphozyten einen Proliferationsarrest verursacht, was, wenn es auf HS/PC ebenfalls zuträfe, den Ausstoß an Immunzellen aus dem Knochenmark beeinträchtigen würde. Ähnliches wurde bereits für das Humane Immundefizienz Virus Typ 1 (HIV-1) beschrieben, das HS/PC infiziert, in ihnen persistiert, aus ihnen reaktivieren kann und den Ausstoß an hämatopoetischen Zellen aus dem Knochenmark reduziert. Zum anderen wurde mit der Entdeckung des SLAM-codes 2005 im murinen System die Expression des MV-Rezeptors CD150 auf HSC

beschrieben. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit gab es noch keine publizierten Studien, die sich mit dem SLAM-code bei humanen HS/PC beschäftigt hatten.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist zunächst die Phänotypisierung humaner HS/PC, um zu ermitteln, ob humanen HS/PC, unter Berücksichtigung der SLAM-code-Markerexpression, ebenfalls verschiedene Differenzierungsstadien zugewiesen werden können. Identifizierte Subpopulationen, besonders eine mögliche CD150⁺-Subpopulation, sollen phänotypisch und funktionell näher charakterisiert werden. Darüber hinaus sollen, wenn bestehend, Unterschiede zwischen gesunden und malignen Stamm- und Vorläuferzellen, aufgedeckt werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird die Auswirkung von MV auf HS/PC untersucht. Die bislang einzige Studie zu diesem Thema hat ein CD150/CD46-dualtropes MV eingesetzt. Dualtrophe MV-Stämme sind jedoch eher als attenuierte Stämme anzusehen, während für wildtypische Stämme bisher nur CD150 als Rezeptor beschrieben wurde. Deswegen gilt das Interesse zunächst den Unterschieden zwischen einer Exposition humaner HS/PC zu wildtypischem und attenuiertem MV-Stämmen, da sich ihre Tropismen *in vitro* erheblich voneinander unterscheiden. Weiterhin soll dieselbe Frage auch für Knochenmarksstromazellen geklärt werden, da die einzigen beobachteten Effekte in besagter Studie nach der Infektion von Stromazellen durch das dualtrophe MV eintraten. Da Stromazellen die Nische der HS/PC bilden, ist zu klären, ob sich eine MV-Exposition dieser Zellen auch auf HS/PC auswirken würde. Da MV keine nennenswerte Plasmavirämie verursacht, ist davon auszugehen, dass eine mögliche Infektion von Knochenmarkszellen nur zellvermittelt eintritt. *In vitro* soll eine mögliche Route ermittelt werden, über die das MV ins Knochenmark gelangen könnte. Darüber hinaus wird ermittelt, ob eine Exposition zu wildtypischem MV irgendeine Beeinträchtigung der Hämatopoese verursacht. Ähnlich den Versuchen mit dem dualtropen Stamm sollen Einflüsse auf das Differenzierungspotential nach MV-Exposition *in vitro*, hierbei erneut sowohl für gesunde als auch für maligne HS/PC, aber darüber hinausgehend auch *in vivo* mittels Xenotransplantation untersucht werden.

2 Material

2.1 Zellen

2.1.1 Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien waren im Institut für Virologie verfügbar und werden im Folgenden mit dem jeweils optimalen Medium, das zur Expansion der Zelllinie benutzt wurde, aufgelistet. Falls für bestimmte Experimente alternative Medien oder Konzentrationen des fötalen Kälberserums (FKS) eingesetzt wurden, ist dies in Kapitel 3 an gegebener Stelle aufgeführt.

Bezeichnung	Ursprung	Medium	Passage
Vero	Fibroblastenzelllinie (Niere), Afrikanische grüne Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>)	MEM/5 % FKS	adhärent, 2xwöchentlich mit ATV
Vero-hSLAM	Vero-Zellen, stabil humanes CD150 exprimierend	RPMI 1640/10 % FKS	adhärent, 2x wöchentlich mit ATV
B95a	B-Zelllinie, EBV-transformiert, Krallenaffe (<i>Callithrix jacchus</i>)	RPMI 1640/5 % FKS	semiadhärent, 2x wöchentlich mit ATV
BJAB	B-Zelllinie, lymphoblastoid (human)	RPMI 1640/10 % FKS	in Suspension, 2x wöchentlich durch Zentrifugation
B97	murin, Hybridomzellen	RPMI 1640/10 % FKS	in Suspension, wöchentlich durch Zentrifugation

Bezeichnung	Ursprung	Medium	Passage
I14	murin, Hybrydomzellen	RPMI 1640/10 % FKS	wöchentlich durch Zentrifugation

Tab. 2.1: Verwendete Zelllinien

2.1.2 Primäre Zellen

Alle primären Zellen, bis auf die Knochenmarksstromazellen, wurden, wie in Kapitel 3 beschrieben, im Zuge diese Arbeit isoliert. Die Stromazellen stellte die Arbeitsgruppe von Thorsten Stühmer (Medizinische Klinik und Polyklinik II, Uniklinik Würzburg) zur Verfügung.

Bezeichnung	Ursprung	Medium	Passage
T-Zellen	human, peripheres Blut, Transfusionsmedizin, Uniklinik Würzburg	RPMI 1640/10 % FKS	nicht passagiert
Stromazellen	human, Knochenmark, Med. Klinik und Polyklinik II, Uniklinik Würzburg	DMEM/20 % FKS	adhärent, wenn konfluent mit ATV
HS/PC	human, Nabelschnurblut, Frauenklinik Würzburg & Missionsärztliche Klinik Würzburg	BBMM	nicht passagiert
LS/PC	human, mobilisiertes peripheres Blut, Transfusionsmedizin, Uniklinik Würzburg	BBMM	nicht passagiert

Tab. 2.2: Verwendete primäre Zellen

2.2 Viren

Die in dieser Arbeit verwendeten Virenstämme, waren alle am Institut für Virologie vorhanden und wurden bei Bedarf auf den angegebenen Zelllinien gezüchtet.

Virusstamm	Rezeptortropismus	Aufzucht auf
Wildtyp Fleckenstein (WTF); Wildtyp	CD150	BJAB
IC323-eGFP; Wildtyp	CD150	Vero-hSLAM
Edmonston-eGFP (ED-eGFP); attenuiert	CD150 / CD46	Vero

Tab. 2.3: Verwendete MV-Stämme

2.3 Zellkulturmedien

Alle Nährmedien, wenn nicht anders angegeben, die 5,6%igen Natriumhydrogencarbonatlösung und die Antibiotikallösung (Penicillin/Steptomycin) wurden von der Mediumküche des Instituts für Virologie hergestellt. Die zugesetzten Zytokine wurden von der Firma Preprotec, das β -Mercaptoethanol von der Firma Gibco, das bovine Serumalbumin (BSA) von der Firma Applichem und das FKS von der Firma Invitrogen bezogen.

Bezeichnung	Medium	Zusätze	Firma
	MEM	5 % FKS 3 % Hydrogencarbonatlösung 0,2 I.E./ml Penicillin/Streptomycin	

Bezeichnung	Medium	Zusätze	Firma
	RPMI 1640	5 bzw. 10 % FKS 3 % Hydrogencarbonatlösung 0,2 I.E./ml Penicillin/Streptomycin	
	IMDM	10 % FKS 0,2 I.E./ml Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
	DMEM	20 % FKS 3 % Hydrogencarbonatlösung 0,2 I.E./ml Penicillin/Streptomycin 1 % Natriumpyruvat	
<i>basal bone marrow medium (BBMM)</i>	IMDM	20 % FKS 3 % Hydrogencarbonatlösung 0,2 I.E./ml Penicillin/Streptomycin 100 µM β-Mercaptoethanol 1 % BSA 50 ng/ml SCF, 10 ng/ml IL-3 50 U/ml IL-6, 10 ng/ml TPO, 10 ng/ml flt-3-Ligand	
MethoCult® GF H4434		methylzellulosehaltiges Komplettmedium für humane HS/PC	STEMCELL TECHNOLOGIES
Einfriermedium	FKS	10 % DMSO	

Tab. 2.4: Verwendete Zellkulturmedien

2.4 Antikörper

Die in der durchflusszytometrischen Analyse eingesetzten Antikörper waren entweder mit dem Fluorochrom Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) oder PE-CY5 konjugiert. Antikörper, die nicht konjugiert waren, sind in Infektionsblockierungsexperimenten oder in fluoreszenzmikroskopischen Analysen eingesetzt worden, wobei bei Letzterem ein fluorochromgekoppelter, sekundärer Antikörper zusätzlich verwendet wurde.

Spezifität	Klon	Konjugat	Isotyp	Hersteller
CD14	M ϕ P9	FITC	Maus IgG ₁	BD
CD19	HIB19	FITC	Maus IgG ₁	BD
CD34	AC136	PE	Maus IgG _{2a}	Miltenyi
CD34	581	PE-CY5	Maus IgG ₁	BD
CD38	HIT2	PE-CY5	Maus IgG ₁	BD
CD45	2D1	FITC	Maus IgG ₁	BD
CD45	HI30	PE	Maus IgG ₁	BD
CD46	E4.3	FITC	Maus IgG ₁	BD
CD46	B97	---	Maus IgG ₁	Institut für Virologie
CD48	TÜ145	FITC	Maus IgG ₁	BD
CD133	AC133	PE	Maus IgG ₁	Miltenyi
CD150	A12	FITC, PE	Maus IgG ₁	AbD Serotec

Spezifität	Klon	Konjugat	Isotyp	Hersteller
CD150	IPO3	---	Maus IgG ₁	biomol
CD244	2B4.69	Alexa-488	Maus IgG ₁	AbD Serotec
Isotyp	S43.10	PE	Maus IgG _{2a}	Miltenyi
Isotyp	MOPC-21	PE, PE-CY5	Maus IgG ₁	BD
Isotyp	X40	FITC	Maus IgG ₁	Miltenyi
Isotyp	MOPC-31C	---	Maus IgG ₁	BD
Isotyp	I14	---	Maus IgG ₁	Institut für Virologie
sekundärer anti-Maus Antikörper	polyklonal	Alexa-488	Hase-IgG	Invitrogen

Tab. 2.5: Antikörperliste

2.5 Kits

Anwendung	Name des Kits	Firma
RNA-Isolierung	RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen
Reverse Transkription	first strand cDNA synthesis Kit & reverse Transkriptase	Fermentas

Anwendung	Name des Kits	Firma
Polymerasekettenreaktion	PuReTaq™Ready-To-Go™ PCR beads	GE Healthcare
Proteinkonzentrationsbestimmung	Bicinchoninic Acid (BCA) Kit	Sigma
HS/PC-Aufreinigung	MACS® CD34-MicroBeads Kit	Miltenyi

Tab. 2.6: Verwendete Kits

2.6 Primer

Die verwendeten Primer wurden basierend auf der cDNA-Sequenz des jeweiligen Gens erstellt, die von der Datenbank National Center for Biotechnology Information (www.pubmed.com) abrufbar ist. In Auftrag wurde die Primersynthese bei der Firma Sigma gegeben. Die oligo-dT-Primer waren Teil des Kits der Firma Fermentas.

Name	Reaktion	Sequenz
oligo-dT	Reverse Transkription	oligo-dT ₍₁₈₎
CD46 III fwd	CD46-PCR	CCGGTACCTGTGAGGAGCCACCAACATTT GA
CD46 III rev	CD46-PCR	AACTGCAGACACTTTGGAAGTGGGGGATC
CD150 fwd Ex	CD150-PCR	AAAGTGCTGCTGCCCTGACATA

Name	Reaktion	Sequenz
CD150 rev Ex	CD150-PCR	CCTGGTTTCTGGACTTGGGCATAG
CD150 III fwd	CD150- <i>nested</i> - PCR	ATCACTGGAGAACAGTGT
CD150 III rev	CD150- <i>nested</i> - PCR	TTCGTTTTACCTGAGGGGTCTG

Tab. 2.7: Primerliste

2.7 Lösungen und Puffer

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Applichem, Amersham, Bayer, BD, cell signaling, Calbiochem, MBI Fermentas, PAA, Pharmacia, Promega und Sigma bezogen oder es standen fertige Lösungen am Institut für Virologie zur Verfügung.

Name	Zusammensetzung
1 %ige Ethidiumbromidlösung	
100 bp DNA ladder (Größenstandard)	
6 x Agarosegel- Ladepuffer	
ACD-A (Zitratpuffer)	

Name	Zusammensetzung
10 x Agarosegel-Laufpuffer	144,0 g Glycin 30,3 g Tris 50 ml 20%ige SDS-Lösung (w/v; in <i>Aqua bidest</i>) ad 1 l <i>Aqua bidest</i> , pH 8,7
ATV	0,8 % (w/v) NaCl 0,04 % (w/v) KCl 0,1 % (w/v) D-Glukose 0,058 % (w/v) NaHCO ₃ 0,05 % (w/v) Trypsin 0,02 % (w/v) EDTA
Bindungspuffer A	20 mM NaH ₂ PO ₄ 20 mM NaHPO ₄ ad a.dest., pH 7,4
Carboxyfluorescein-(5-,6-) diacetats (CFSE)-Lösung	2,5 µM CFSE 5 % FKS PBS
DRAQ5 TM	1:2000 in PBS
Elutionspuffer	0,1 M Glycin-HCl ad aqua dest., pH 2,7
Erythrozytenlyse-Puffer	10 ml 10 x KHCO ₃ (1 g KHCO ₃ ad 100 ml <i>Aqua bidest</i>) 10 ml 10 x NH ₄ Cl (8,3 g NH ₄ Cl ad 100 ml <i>Aqua bidest</i>) 20 µl 0,5 M EDTA, pH 8 ad 100 ml <i>Aqua bidest</i>

Name	Zusammensetzung
FACS-Puffer	0,5 % (w/v) BSA 0,02 % NaN ₃ PBS
MACS-Puffer	0,5 % (w/v) BSA 2 mM EDTA PBS
Natriumazid-Lösung	32 % w/v
PBS	80 g NaCl 2 g KCl 11,5 g Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O 2 g KH ₂ PO ₄ ad 1 l <i>Aqua bidest</i>
Puffer für Organentnahme	0,3 % BSA PBS
<i>Solution 1 for primary Antibodies</i>	
<i>Solution 2 for secondary Antibodies</i>	
TAE-Puffer (50x)	242 g Tris 57,1 ml Essigsäure 100 ml EDTA (0,5 M; pH 8) ad 1 l <i>Aqua bidest</i>
Trypanblaulösung	0,4 % (w/v) Trypanblau PBS

Name	Zusammensetzung
Triton-X-100-Lysepuffer	150 mM NaCl 50 mM HEPES 5 mM EDTA 1 % (v/v) Triton X-100 <i>Aqua bidest</i>
Versene-Lösung	1 g KCl 1 g KH ₂ PO ₄ 2,86 g Na ₂ HPO ₄ 41 g NaCl 1 g Versene ad 5 l <i>Aqua bidest</i>

Tab. 2.8: Puffer und Lösungen

2.8 Chemekalien

Chemikalie	Firma
7-AAD	BD
Agarose	Applichem
β -Mercaptoethanol	Gibco
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Applichem
DMSO	Applichem
DRAQ5 TM	cell signaling
EDTA	Sigma

Chemikalie	Firma
Essigsäure	Applichem
Ethanol absolut	Applichem
Ficoll, Lymphocyte Separation Medium LSM 1077	PAA
Fluoromount-G	SouthernBiotech
Glucose	Applichem
Glycin	Applichem
HEPES	Applichem
Natriumpyruvat	Sigma
Paraformaldehyd	Applichem
Protein-G-Sepharose TM 4 Fast Flow	Sigma
Proteinstandardlösung 1,0 mg/ml	Sigma
Tris	Applichem
Triton X-100	Sigma

Tab. 2.9: Chemikalienliste

2.9 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Firma
6-, 24-, 96-, 96 (1/2 area)-Napf-Zellkulturplatten	Greiner
0,5-, 1,5-, 2-ml-Reaktionsgefäße	Eppendorf
15-, 50-ml-Röhrchen	Greiner
50-, 250-, 550-ml-Zellkulturflaschen	Greiner
<i>Chamber Slides, Lab-Tek II</i>	Nunc
Durchflusszytometrierröhrchen	BD
Dialyseschlauch	Roth
Einmalküvetten	Roth
Filter, <i>cell strainer</i> , 70 µm Porengröße	BD
Kryokonservierungsröhrchen	Greiner
MACS [®] MS-Säulen	Miltenyi
Membranfilter 0,2 µm	Schleicher & Schuell
Spritzen und Kanülen	Godan, Primo, Dispomed, BD
<i>Trans-well-filter</i> , Porengröße 4 µm	Falcon
Zellschaber	Hartenstein

Tab: 2.10: Liste der Verbrauchsmaterialien

2.10 Tiermodell

Für die Xenotransplantationsexperimente wurden NOD/SCID-IL2R γ ^{-/-}-Mäuse aus der Kolonie NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ.v. verwendet, die aus der Zucht des Zentrums für experimentelle molekulare Medizin (ZEMM) stammten. Transplantiert wurden HS/PC ausschließlich in weibliche Tiere im Alter von 6 - 12 Wochen.

2.11 Geräte

Gerät	Firma
Analysenwaage	Sartorius
BioPhotometer 6131	Eppendorf
Durchflusszytometer FACScalibur™	BD
Durchflusszytometer FACS DIVA™	BD
Fluoreszenzmikroskop	Leitz
Inkubator	Heraeus
Inversmikroskop Labovert FS	Leitz
konfokales Laserscanningmikroskop LMS510 Meta	Leitz
Magnetheizrührer Ikamag RCT	IKA Labortechnik
Mehrkanalpipetten	Abimed
Mikropipetten	Gilson
PCR-Maschine, PTC-200 Thermo Cycler	Biorad

Gerät	Firma
pH-Meter	Mettler Toledo
Schüttler	Bühler
Sterilwerkbank	Nuaire
Spannungsquellen	Gibco, BioRad
Tischzentrifuge	Hettich
VarioMACS [®] Seperator, Magnet	Miltenyi
Vortexer	Bender & Hobein
Wippschüttler	Bühler
Zählkammer nach Neubauer	Superior Marienfeld
Zentrifugen	Hettich,

Tab. 2.11: Geräteliste

2.12 Software

Name	Firma
CellQuest [™] PRO	BD
FlowJo	Tree Star, Inc.

Tab. 2.12: Software

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Alle verwendeten Zelllinien und primäre Zellen wurden in dem entsprechenden Medium, das zuvor mit 3 % einer 5,6 %igen Natriumhydrogencarbonatlösung gepuffert und mit Antibiotika (0,2 I.E./ml Penicillin/Streptomycin) versetzt wurde, in Zellkulturflaschen oder Multi-Loch-Platten kultiviert. Zusätzlich wurde dem Medium, wenn nicht anders angegeben, je nach Zelllinie ein bestimmter Anteil FKS zugegeben (Tab.: 2.1 & 2.2). Die Zellen wurden im Brutschrank in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂-Gehalt bei 37°C inkubiert.

3.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Die adhärenenten Zelllinien Vero, Vero-hSLAM und B95a wurden in den in Tab. 2.1 angegebenen Medien kultiviert bis sie zu einem konfluenten Zellrasen angewachsen waren. Daraufhin wurde das Medium entfernt und der Zellrasen mit ATV gewaschen, um Mediumrückstände zu entfernen. Anschließend wurde erneut ein kleines Volumen ATV zugegeben und die Zellen einige Minuten inkubiert. Sobald sich die Zellen vom Gefäßboden lösten, wurde Medium hinzugegeben und die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. 1/10 bis 1/5 der Zellsuspension wurde anschließend pro neues Zellkulturgefäß ausgesät und mit frischem Medium versehen.

Die in Suspension wachsende Zelllinie BJOB wurde 1 - 2 mal pro Woche für 5 min bei 400 g zentrifugiert und das Pellet in 10ml frischem Medium resuspendiert. 1/3 bis 1/2 der Suspension wurde dann pro Zellkulturflasche ausgesät und mit frischem Medium versehen.

Mit den ebenfalls in Suspension wachsenden Hybridomzelllinien wurde genauso verfahren, nur dass zur Antikörpergewinnung das alte Medium aufbewahrt wurde.

3.1.2 Humane hämatopoetische Stamm/Vorläuferzellen (HS/PC)

Humane HS/PC wurden aus zwei unterschiedlichen Quellen gewonnen. Zum einen standen für diese Studie tiefgefrorene Leukaphereseprodukte verstorbener

Leukämiepatienten zur Verfügung und zum anderen Blut, das aus Plazenten bzw. Nabelschnüren (umbilical cord blood, UCB) stammt.

Die Leukaphereseprodukte waren ursprünglich für eine zukünftige autologe Stammzelltransplantation vorgesehen. Zu diesem Zweck wurde den Patienten 7 Tage lang GM-CSF verabreicht. Dies führt zu einer Mobilisierung der HS/PC im Knochenmark, welche daraufhin vermehrt ins periphere Blut gelangen. Obwohl der Ursprung dieser HS/PC im Knochenmark liegt, darf man sie aufgrund der vorangegangenen Mobilisierung nicht mit HS/PC gleichstellen, die aus Knochenmarksaspiraten gewonnen werden. Vor der Verwendung der Leukaphereseprodukte lagerten diese mit DMSO versetzt in flüssigem Stickstoff.

Das UCB wurde unmittelbar nach einem geplanten Kaiserschnitt im Arbeitsraum der Frauenklinik Würzburg aus der Plazenta/Nabelschnur in einem Erlenmeyerkolben aufgefangen, in dem 20 ml ACD-A vorgelegt waren um eine Gerinnung des Blutes zu verhindern, oder von den Hebammen der Missionsärztlichen Klinik Würzburg in Heparinröhrchen aufgefangen.

Aus beiden Ausgangsmaterialien wurden zunächst mononukleäre Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Dazu wurde das Ausgangsmaterial im Verhältnis 1:2 bis 1:4 mit Versene verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden je 35 ml auf 15 ml Ficoll-Paque geschichtet und 30 min (2 min Anlauf, 2 min Auslauf, 400 g, 20°C) zentrifugiert. Nach der Trennung der Zellen entsprechend ihrer Dichte, wurde die entstandene Interphase, welche sich oberhalb des Ficoll-Paque befand und die mononukleären Zellen enthielt, in ein neues 50 ml-Röhrchen überführt. Dabei wurden immer höchstens zwei Interphasen in ein neues Röhrchen vereinigt. Anschließend wurden die Zellen 2-3 mal mit PBS gewaschen (10 min, 400 g, 20°C), bevor die Zellzahl durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt wurde. Die Zellen wurden erneut pelletiert und in einer Dichte von 1×10^8 Zellen/300 μ l in MACS-Puffer resuspendiert. Je 300 μ l Suspension wurden zunächst mit 100 μ l FCR *blocking reagent* versetzt bevor 100 μ l anti-CD34-Magnetpartikel hinzugegeben wurden. Nach 30 min Inkubation bei 4°C wurden die Zellen mit dem 10fachen Volumen MACS-Puffer gewaschen (10 min, 400 g, 4°C). Anschließend wurden die Zellen in einer

Dichte von 1×10^8 Zellen/500 μ l in MACS-Puffer resuspendiert und waren bereit für die magnetische Isolierung.

Eine MACS MS-Säule wurde in den vorgesehenen Magneten gespannt und mit 500 μ l Macs-Puffer equilibriert. Dann wurde die Zellsuspension in die Säule gegeben, durch die sie dann tropfte. An die HS/PC, die das Antigen CD34 auf der Oberfläche exprimieren, sollte während der 30minütigen Inkubation die mit Magnetpartikel konjugierten anti-CD34 Antikörper gebunden haben. Solche markierten Zellen werden nun durch den Magneten in der MACS-Säule zurückgehalten. Nach dreimaligem Waschen der Säule mit je 500 μ l MACS-Puffer, wurde die Säule vom Magneten entfernt und die in der Säule verbliebenen HS/PC mit 1 ml MACS-Puffer eluiert. Mit dem Eluat und einer neuen MACS MS-Säule wurde die Prozedur wiederholt, um eine hohe Reinheit der HS/PC zu erreichen. Ein Teil der so gewonnenen HS/PC wurde benutzt, um den Grad der Reinheit durchflusszytometrisch zu bestimmen. Dazu wurden die Zellen mit 7AAD, anti-CD45- und anti-CD34-Antikörpern markiert. Die beiden Antikörper waren mit den Fluoreszenzfarbstoffen FITC (CD45) bzw. PE (CD34) konjugiert und 7AAD ist ein Totfarbstoff, der nur tote Zellen anfärbt. Die Reinheit der HS/PC wurde als Anteil $CD34^+$ -Zellen an der Gesamtzahl lebender $CD45^+$ -Zellen errechnet. Hierfür wurde die durchflusszytometrische Messung mit der Software FlowJo oder CellQuest Pro analysiert (Abb.: 4.1). Alle gemessenen Ereignisse wurden zunächst bezüglich der CD45-Expression hin aufgeteilt. Von den $CD45^+$ - Zellen wurden die lebenden, 7AAD-negativen Zellen im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht daraufhin kontrolliert, dass sie an der für Lymphozyten zu erwartenden Stelle angezeigt werden. Von diesen lebenden, $CD45^+$ -Lymphozyten wurde nun die CD34-Expression dargestellt. Alle isolierten HS/PC wurden sofort für Experimente benutzt und vorher nicht in Kultur gehalten. Wurden im Zuge eines Experiments die HS/PC in Suspension kultiviert, geschah dies im Medium BBMM/20 % FKS, das die Zytokine SCF, IL-3, IL-6, TPO und Flt3-Ligand enthielt. Diese Kombination von Zytokinen erlaubt es den HS/PC in Suspensionskultur ihren undifferenzierten Status länger zu erhalten als in einer vergleichbaren Kultur ohne Zytokine.

3.1.3 Kolonienwachstumstest (colony forming assay, CFA)

Humane HS/PC wurden entweder unbehandelt oder MV- bzw. Mock-exponiert im CFA eingesetzt. Dazu wurden die HS/PC entweder sofort oder nach der einstündigen MOCK- bzw. MV-Exposition gewaschen und in IMDM/10 %FKS resuspendiert. 500 HS/PC in 125 µl Medium wurden mit 1,125 ml kaltem methylzellulosehaltigem Medium (MethoCult®) gemischt. Von diesem Gemisch wurde 1 ml, was 400 Zellen entspricht, in einer 35 mm Petrischale luftblasenfrei ausgesät. Jeder CFA wurde als Dreifachansatz durchgeführt, mit Ausnahme der CFA mit durchflusszytometrisch sortierten HS/PC, die aufgrund der begrenzten Zellzahlen im Zweifachansatz durchgeführt wurden. Bis zu sechs 35 mm Petrischalen wurden in eine 12 cm Petrischale gestellt, in die zusätzlich eine offene mit sterilem Wasser gefüllte 35 mm Petrischale gestellt wurde, um eine wasserdampfgesättigte Atmosphäre zu garantieren. Die ausgesäten HS/PC wurden nun 14 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die im MethoCult enthaltenen Zytokine SCF, GM-CSF, IL-3 und EPO forcieren die hämatopoetischen Vorläuferzellen (HPC) zu differenzieren was zur Bildung von myeloiden und erythroiden Vorläuferkolonien führt. Die hämaopoetischen Stammzellen (HSC) tragen bei diesem Kurzzeitversuch nicht zur Bildung von Kolonien bei. Nach 14 Tagen wurden die Kolonien lichtmikroskopisch bestimmt und gezählt.

3.1.4 Knochenmarksstromazellen

Humane Knochenmarksstromazellen wurden von Dr. Thorsten Stühmer zur Verfügung gestellt. Sie wurden aus Knochenmarksaspiraten des Beckenkamms isoliert. Nach Dichtegradientenzentrifugation der Aspirote, wurden die mononukleären Zellen in Zellkulturgefäßen ausgesät und 3 Wochen lang kultiviert. Durch regelmäßiges Waschen wurden Zellen, die nicht adhärent wuchsen, aus der Kultur entfernt. Nach drei Wochen wurde morphologisch bestimmt, ob ein Stroma angewachsen war. Solche für gut befundenen Stroma wurden dann für diese Studie benutzt. Die Zellen wuchsen in DMEM/20 %FKS und wurden nach Erreichen der Konfluenz genauso wie adhärente Zelllinien behandelt, jedoch mit der Besonderheit, dass sie niemals höher als 1/2 gesplittet wurden.

3.1.5 Primäre T-Zellen

Primäre T Zellen wurden aus mononukleären Zellen des peripheren Bluts (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) angereichert. Dazu macht man sich zu Nutze, dass B Zellen und Monozyten im Gegensatz zu T-Zellen an Nylonwolle adhärieren. Durch eine Passage über Nylonwolle erhält man so eine mit T-Zellen angereicherte Suspension, während Monozyten und B-Zellen in der Nylonwolle zurück gehalten werden. Dazu wurde eine 50 ml Spritze mit 2 g Nylonwolle gefüllt und autoklaviert. Am Ausgang der Spritze wurde ein Schlauch angebracht, der mit einer Metallklemme versehen war, so dass man den Abfluss aus der Spritze kontrollieren kann. Die Spritze wurde zur Equilibrierung mit warmem RPMI 1640/5 % FKS gefüllt und Luftblasen wurden durch Zusammendrücken der Nylonwolle entfernt. Dann wurde über den Schlauch überschüssiges Medium wieder abgelassen, so dass nur noch die Nylonwolle komplett mit Medium bedeckt ist. Nun wurden PBMC (2×10^8 PBMCs in 7 ml RPMI 1640/5 % FKS) auf die Säule gegeben. Durch weiteres Ablassen überschüssigen Mediums über den Schlauch sanken die PBMC in die Nylonwolle ein. Nun wurden, um Austrocknung zu verhindern, noch einige Milliliter Medium auf die Säule pipitiert und diese dann für 45 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die nicht an die Nylonwolle adhärerten T-Zellen mit 25 ml RPMI 1640/5 % FKS aus der Spritze eluiert. Die eluierten Zellen wurden anschließend für 5 min bei 400 g und RT pelletiert und in RPMI 1640/10 % FKS in einer Konzentration von $2-5 \times 10^6$ /ml resuspendiert. Da ruhende T-Zellen kein oder wenig CD150 auf der Oberfläche exprimieren, wurden T-Zellen vor einer Infektion mit MV über Nacht mit Phorbol 12-myristat-13-acetat (PMA) und Ionomycin (Iono) präaktiviert. Dazu wurden die Zellen bei 400 g für 5 min und RT zentrifugiert und in RPMI 1640/10 % FKS + 0,1 ng/ml PMA und 0,5 nM Iono resuspendiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.1.6 Bestimmung der Lebendzellzahl

Vor allen Experimenten wurde stets die Lebendzellzahl der einzusetzenden Zellsuspension bestimmt. Dies ist insbesondere bei frisch isolierten, primären Zellen wichtig, da es während der Aufreinigung zu Zellschäden kommen kann. Die Lebendzellzahl wurde durch eine Vitalfärbung mit Trypanblau bestimmt. Dies ist ein Farbstoff, der nicht membrangängig ist und deshalb von lebenden Zellen nicht

aufgenommen wird. In Zellen mit beschädigter Zellmembran kann Trypanblau eindringen, so dass sie im Lichtmikroskop blau erscheinen. Zur Bestimmung wurden 10 µl Zellsuspension mit 10-90 µl Trypanblaulösung gemischt. Von dieser Mischung wurden 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Gesamtzellzahl konnte nun mit Hilfe des Kammerfaktors und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (Zellsuspension:Trypanblaulösung) bestimmt werden. Anschließend wurde die Zellsuspension für die folgenden Experimente auf die gewünschte Zellkonzentration eingestellt.

3.1.7 Kryokonservierung

Zur längeren Aufbewahrung wurden Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden die Zellen suspendiert und dann bei 400 g und RT für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in kaltem FKS in einer Konzentration von 2×10^7 Zellen/ml resuspendiert. 500 µl dieser Suspension wurden in ein Kryoröhrchen überführt, in welchem bereits 500 µl kaltes FKS/20 % DMSO vorgelegt war. Die beiden Lösungen wurden unverzüglich durch Vortexen miteinander vermischt und dann für 1h bei -20°C runtergekühlt. Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei -80°C gelagert bevor sie dann in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt wurden.

Um kryokonservierte Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden diese im 37°C warmen Wasserbad zügig aufgetaut und zweimal mit 10ml vorgewärmtem Medium gewaschen, um das bei RT toxische DMSO zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium ausgesät.

3.2 Virologische Methoden

3.2.1 Viruszucht

Viruspräparate wurden auf den Zelllinien Vero, Vero-hSLAM und BJAB hergestellt. Vero-Zellen wurden benutzt, um den attenuierten ED-eGFP-Stamm zu züchten, da dieser auch CD46-trop ist und somit auch Verozellen infizieren kann. Die Verozellen wurden in Zellkulturflaschen kultiviert bis sie den Gefäßboden mit ca. 60 % Konfluenz bedeckten. Bei einer 550 ml-Zellkulturflasche entspricht dies einer

Zellzahl von ca. 1×10^7 . Nun wurden die Zellen mit einer Infektionsdosis (multiplicity of infection, M.O.I.) von 0,01 infiziert. Dazu wurde das Medium entfernt und in jede Zellkulturflasche 10 ml FKS-freies MEM, welches die entsprechende Virendosis enthielt, gegeben. Bei 37°C wurden die Zellen auf einem Schwenktisch für 1 h mit dem Virus inkubiert. Anschließend wurde die Viruslösung abgenommen und durch frisches MEM/5 %FKS ersetzt. Die Zellen wurden nun im Inkubator so lange kultiviert, bis anhand des zytopathischen Effekts (cytopathic effect, CPE) eine maximale Ausbreitung der Infektion lichtmikroskopisch erkennbar war. War dies der Fall, wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 2 ml PBS pro Flasche überschichtet und über Nacht bei -20°C eingefroren. Nach schnellem Auftauen wurde der Zellrasen vom Gefäßboden geschabt und in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Durch 15 Minuten Zentrifugation bei 0°C und 1000 g wurden Zelltrümmern entfernt. Der Überstand wurde bis auf 3 ml in ein neues Gefäß überführt und auf Eis gestellt. Da MV zu einem großen Teil membrangebunden vorliegt, enthält das Pellet einen hohen Anteil an infektiösen Partikeln. Um auch diese zu gewinnen wurde das Pellet in den restlichen 3 Millilitern resuspendiert und in ein *Douncer* überführt. Im *Douncer*, ein Glasröhrchen mit passendem Kolben, wurden durch mehrmaliges Auf- und Abführen des Kolbens Virenpartikel mechanisch von vorhandenen Membranstrukturen befreit. Die entstandene Lösung wurde erneut für 15min bei 0°C und 1000 g zentrifugiert und der Überstand mit der bereits gesammelten Viruslösung vermischt. Anschließend wurde die Lösung in je 500 µl Aliquots in Kryoröhrchen aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

Der CD150-trope Wildtypstamm IC323-eGFP wurde in Vero-hSLAM-Zellen gezüchtet, die humanes CD150 stabil exprimieren. Die Prozedur unterscheidet sich nicht von der ED-eGFP-Zucht. Der CD150-trope Wildtypstamm WTF wurde in BJAB-Zellen gezüchtet. Dazu wurden 5×10^7 Zellen in 10 ml FKS-freiem RPMI1640 mit einer MOI von 0,01 für 1h bei 37°C in einem 50 ml-Röhrchen auf einem Schwenktisch infiziert. Anschließend wurden die Zellen bei 400 g für 10 min bei RT pelletiert und der Überstand verworfen. In 100 ml RPMI1640/10 %FKS wurden die Zellen resuspendiert und in einer 250 ml-Zellkulturflasche im Inkubator für 2-3 Tagen kultiviert. Sobald sich die Infektion maximal ausgebreitet hatte, aber noch bevor die ersten Synzytien platzten, wurden die Zellen auf 10 50 ml-Zellkulturflaschen mit

frischen BJAB-Zellen aufgeteilt. Diese 10 Flaschen wurden weitere 2-3 Tage inkubiert, bis ca. 80-90 % der Zellen einen CPE aufwiesen. Nun wurden die Zellen bei 400 g und RT für 10 min zentrifugiert und alle 10 Pellets in insgesamt 10 ml PBS resuspendiert. Die Suspension wurde über Nacht bei -20°C eingefroren und anschließend wurden freie Viruspartikel wie bei der ED-eGFP-Zucht bereits beschrieben gewonnen und gelagert.

Parallel zu jeder Viruszucht wurden auch immer MOCK-Präparate hergestellt, die in folgenden Experimenten als Negativkontrolle dienten. Zur Herstellung eines MOCK-Präparats wurden Zellen genauso wie bei der parallel laufenden Viruszucht behandelt, ohne jedoch vorher infiziert worden zu sein.

3.2.2 Bestimmung des Virustiters

Der Virustiter einer Viruspräparation oder von Überständen wurde durch die Endpunkttitration TCID_{50} (tissue culture infectious dose 50) ermittelt, die angibt, bei welcher Verdünnung der Virussuspension noch 50 % der Zellen infiziert werden. Für die Titration wurden 5×10^4 B95a-Zellen pro Napf einer 96-Loch-Platte mit halber Bodenfläche ausgesät und über Nacht in RPMI1640/5 % FKS inkubiert. Von der zu titrierenden Lösung wurde mit FKS-freiem RPMI1640 eine Verdünnungsreihe hergestellt. Im Falle von Viruszuchtlösungen wurde in 1:10-Schritten verdünnt, bei Stromazellkulturüberständen in 1:2-Schritten. Von den über Nacht adhärent angewachsenen B95a-Zellen wurde das Medium abgenommen und je 8 Näpfe der 96-Loch-Platte mit 100 μl einer Verdünnungsstufe versetzt. 8 weitere Näpfe wurden mit 100 μl MOCK-Lösung versetzt. Die Zellen wurden dann für 1 h bei 37°C mit dem Virus inkubiert. Anschließend wurden die MOCK- bzw. Viruslösungen von den Zellen pipettiert und durch frisches RPMI 1640/5 % FKS ersetzt. Nach 3 weiteren Tagen der Inkubation wurde lichtmikroskopisch an Hand zytopathischer Effekte die Anzahl der Näpfe mit infizierten Zellen ermittelt. Mit diesen Werten konnte mit Hilfe der Formeln nach Spearman und Kärber die TCID_{50} berechnet werden.

$$\log TCID_{50} = x_{p=1} + \frac{1}{2}d - d \sum p$$

Tab. 3.1: Formel zur Bestimmung der TCID₅₀

$x_{p=1}$: dekadischer Logarithmus der höchsten Verdünnungsstufe, bei der noch in allen Näpfen ein CPE detektiert werden kann, d : dekadischer Logarithmus des Verdünnungsfaktors, p : Anteil an CPE-positiver Näpfe pro Verdünnungsstufe, $\sum p$: Summe aller p ab der Verdünnungsstufe $x_{p=1}$ und den p -Werten aller höheren Verdünnungen mit detektiertem CPE. Berechnet wird der dekadische Logarithmus der Verdünnungsstufe, bei der 50% der Ansätze einen CPE aufweisen.

$$SE \log TCID_{50} = \sqrt{d^2 \sum \frac{p(1-p)}{n-1}}$$

Tab. 3.2: Formel zur Berechnung des Standardfehlers der TCID₅₀

d : dekadischer Logarithmus der Verdünnungsstufe, p : Anteil CPE-positiver Näpfe pro Verdünnungsstufe, n : Anzahl der Näpfe pro Verdünnungsstufe

3.2.3 Infektion von Zelllinien und primären Zellen

Zelllinien und primäre Zellen, die in Suspension wuchsen, wurden gezählt und die benötigte Anzahl an Zellen wurde anschließend zentriugiert (400 g, 5 min, RT). Das Pellet wurde in FKS-freiem, den Zellen entsprechendem, Medium resuspendiert, dem zuvor die entsprechende Menge Virus- bzw MOCK-Lösung zugesetzt wurde. Bei 37°C wurden die Zellen nun auf einem Schwenktisch für 1 h mit den Viruspartikeln inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen erneut zentrifugiert (400 g, 5 min, RT) und in entsprechendem, vorgewärmtem FKS-haltigem Medium resuspendiert, wodurch nicht gebundene Virenpartikel entfernen wurden. Adhären wachsende Zelllinien und primäre Zellen wurden am Tag vor der Infektion in dem entsprechenden Zellkulturgefäß ausgesät. Die Anzahl an ausgesäten Zellen wurde so ausgewählt, dass sie über Nacht zu einem ca. 70 % konfluentem Zellrasen

anwachsen. Für die Infektion wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit dem entsprechendem FKS-freien Medium, das mit Virus- bzw. MOCK-Lösung versetzt war überschichtet. Die Zellen wurden für 1 h bei 37°C auf einem Schwenktisch mit dem Virus inkubiert. Anschließend wurde das Inokulum abgenommen und die Zellen mit vorgewärmtem FKS-haltigem Medium überschichtet.

Waren die infizierten Zellen anschließend für ein Transmissionsexperiment vorgesehen (s. Kapitel 3.2.4), wurden sie vor der Aufnahme in FKS-haltigem Medium zusätzlich noch ein Mal mit PBS gewaschen, um zu garantieren, dass alle ungebundenen Virenpartikel entfernt wurden.

3.2.4 Virustransmission in Kokultur

Die Frage ob sich die MV-Infektion von infizierten Zellen einer Art auf Zellen einer anderen Art übertragen lässt, wurde durch Kokultivierung beider Zelltypen untersucht. Die Virustransmission zwischen Knochenmarksstromazellen und HS/PC bzw. Lymphozyten wurde in 6- bzw. 96-Lochplatten untersucht. Kokulturen mit Knochenmarksstromazellen wurden in 6-Lochplatten durchgeführt. Sobald das Stroma zu 70 - 100 % konfluent war, wurde das Medium von den Zellen abgenommen und durch 1 ml FKS-freies Stromazellmedium ersetzt, das die entsprechende Menge Virus- bzw. MOCK-Lösung enthielt, um die Zellen mit einer M.O.I. von 2 zu infizieren. Nach einstündiger Infektion wurde das Inokulum entfernt und das Stroma ein Mal mit PBS gewaschen, um ungebundene Virenpartikel zu entfernen. Anschließend wurden 5×10^4 - 1×10^5 HS/PC zu den Stromazellen gegeben. Da die Knochenmarksstromazellen auch andere Medien als ihr eigenes gut vertragen, wurden Kokulturen immer mit dem Medium des jeweiligen Suspensionszelltyps angesetzt. Die Transmission des MV von HS/PC bzw. Lymphozyten zu Stromazellen fand unter den gleichen Bedingungen statt, nur dass in diesem Fall nicht die Stromazellen, sondern die Suspensionszellen vor Ansetzen der Kokultur für eine Stunde MV- bzw. MOCK-exponiert wurden (s. Kapitel 3.2.3). Die eingesetzte M.O.I. für diese Transmissionsversuche betrug für HS/PC 5 und 0,5 für die beiden Lymphozytenarten (primäre, präaktivierte T-Zellen und BJAB-Zellen). Mit den Knochenmarksstromazellen wurden 5×10^4 - 1×10^5 HS/PC bzw. Lymphozyten pro

6-Lochplattennapf kokultiviert. Bei dieser Art der Kokultur kommt es zum direkten Kontakt zwischen den beiden Zelltypen. Um zu untersuchen, ob eine Transmission zwischen Stromazellen und infizierten Lymphozyten auch ohne Zell-Zellkontakt stattfindet, wurden die zwei Zelltypen durch einen Filtereinsatz (*transwellfilter*) mit 4 µm Porengröße voneinander getrennt, so dass nur freigesetzte Virenpartikel zu den Stromazellen diffundieren konnten. Die verwendeten Virenstämme in den Transmissionsexperimenten waren IC323-eGFP und ED-eGFP, so dass die Transmission fluoreszenzmikroskopisch analysiert werden konnte.

Die Virustransmission infizierter Lymphozyten zu HS/PC wurde durchflusszytometrisch analysiert. Dazu wurden BJAB-Zellen oder präaktivierte, primäre T-Zellen mit IC323-eGFP mit einer M.O.I. von 0,1 infiziert und anschließend mit HS/PC in einem Napf einer 96-Lochplatte im Verhältnis 1:1 für 48 h kokultiviert. Die Kokultur fand im für HS/PC optimalen Medium BBMM/20 % FKS, das die Zytokine SCF, IL-3, IL-6, TPO und Flt3-Ligand enthielt, statt.

3.2.5 Infektionsblockierung mittels Antikörper

Eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Infektion mit freien MV-Partikeln ist die Bindung an einen zellulären Rezeptor. Um die Rolle der beiden bekannten MV-Rezeptoren bei der Infektion von Stromazellen zu überprüfen, wurde die Interaktion des viralen H-Proteins mit CD150 bzw. CD46 durch blockierende Antikörper inhibiert. Rezeptorbindende Antikörper blockieren sterisch die Bindung des H-Proteins. Damit eine Absättigung der Bindestellen mit Antikörpern gewährleistet ist, wurden Stromazellen, die über Nacht in 6-Lochplatten zu 70 - 100 % Konfluenz anwuchsen für eine Stunde im Inkubator in Medium kultiviert, das 20 ng/ml Antikörper enthielt. Zur Blockade der Infektion via CD150 wurde der Antikörper IPO3 und zur Blockade der Infektion via CD46 der Antikörper 10/88 benutzt. Als Negativ- bzw. Isotypkontrolle diente der Antikörper I14. Anschließend wurde das Medium durch FKS-freies Medium ersetzt, das sowohl MV für eine Infektion mit einer M.O.I. von 2, als auch 20 ng/ml des jeweiligen Antikörpers enthielt. So wurden die Zellen für 1 h im Inkubator kultiviert. Anschließend wurde das Inokulum entfernt und durch frisches FKS-haltiges Medium, das ebenfalls 20 ng/ml Antikörper enthielt, ersetzt und die Zellen mehrere Tage inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Grad

der Infektion fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert. Als Positivkontrolle wurden Vero-Zellen (CD46-Blockade) bzw. Vero-hSLAM-Zellen (CD150-Blockade) benutzt.

3.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Hochdurchsatzmethode zur Untersuchung von Zellen nach Anregung mit einem Laserstrahl. Zellen, die den Lichtstrahl in einer transparenten Kapillare passieren, können aufgrund der verursachten Lichtstreuung morphologische Eigenschaften wie Größe und Granularität zugeschrieben werden. Zusätzlich ermöglicht das Durchflusszytometer die Lichtemission fluoreszierender Farbstoffe zu detektieren. In der vorliegenden Arbeit wurden vor allem die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle und die Vitalität der Zellen untersucht. Alle Messungen wurden an einem Vier-Farben-Durchflusszytometer (FACS-Calibur™, BectonDickenson) durchgeführt. Die erzeugten Daten wurden mit den Programmen CellQuestPro und FlowJO ausgewertet. Die Anzahl der gemessenen Ereignisse pro Messung hing von der Art des Experiments und von der Verfügbarkeit des Zellmaterials ab. Zur Bestimmung der HS/PC-Reinheit wurden 5×10^4 - 1×10^5 Ereignisse gemessen, bei den Transplantationsexperimenten wurden nach 13 Wochen-Experimenten mindestens 2×10^5 , nach 7 Tage-Experimente 5×10^5 und nach 40h-Experimenten 7×10^5 Ereignisse gemessen.

3.3.1 Oberflächenfärbung

Die Expression von Oberflächenmolekülen wurde durch Immunfärbung mit Antikörpern, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert waren, ermittelt. An Zellen, die das zu analysierende Molekül exprimieren, binden die Antikörper, wodurch sie dann bei der durchflusszytometrischen Messung fluoreszieren. Für die Färbung wurden die Zellen zunächst zweimal nacheinander pelletiert (5 min, 400 g, 4°C) und in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen erneut pelletiert und in 200 µl FACS-Puffer, das die jeweiligen, fluoreszenzkonjugierten Antikörper im Verhältnis 1:100 enthielt, resuspendiert und für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden nach der Inkubationszeit durch zweimaliges Waschen mit FACS-Puffer entfernt, wobei die Zellen letztlich in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert wurden. Als Negativkontrolle wurden parallel Zellen mit

Kontrollantikörpern inkubiert, die zwar derselbe Isotyp waren, aber kein Epitop auf den Zellen binden (Isotypkontrolle). In dem Fall, dass auch eine Vitalfärbung durchgeführt werden sollte, wurde 1 µl 7AAD zu der 200 µl-Zellsuspension pipettiert und die Suspension für 10 min auf Eis gestellt, bevor mit der Messung begonnen werden konnte. 7AAD ist eine in die DNA interkalierende und fluoreszierende Substanz, die jedoch nicht membrangängig ist, weswegen sie nur in tote Zellen ohne intakte Zellmembran eindringen kann. Dadurch lassen sich tote, 7AAD-positive von lebenden, 7AAD-negativen Zellen durchflusszytometrisch unterscheiden.

3.3.2 Durchflusszytometrische Sortierung von Zellen

Neben der reinen Analyse bietet die Durchflusszytometrie auch die Möglichkeit Zellen nach bestimmten Merkmalen zu sortieren. Das Prinzip ist dasselbe wie bei der Analyse, nur das nach Detektion der Zellmerkmale (z.B. Fluoreszenz) die Zellen sortiert aufgefangen werden und für weiterführende Versuche zur Verfügung stehen. HS/PC wurden mit dieser Methode in CD34⁺/CD150⁺- und CD34⁺/CD150⁻-Fraktionen aufgeteilt. Dazu wurden sie wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben mit fluorochromgekoppelten Antikörpern gefärbt. Da 7AAD auf längere Sicht toxisch für Zellen ist, wurde auf eine Vitalfärbung verzichtet. Aus demselben Grund würde die Immunfärbung auch nicht mit dem natriumazidhaltigen FACS-Puffer, sondern mit MACS-Puffer durchgeführt. Sortiert wurden die Zellen mit dem Gerät FACS Diva der Firma BectonDickenson.

3.3.3 CFSE-Färbung

Durch die Verwendung des zunächst farblosen Carboxyfluorescein-(5-,6-)diacetats (CFSE), ist es möglich die Proliferation von Zellen durchflusszytometrisch nachzuweisen. Inkubiert mit CFSE nehmen Zellen durch passive Diffusion den Farbstoff irreversibel auf. Eine durch zelluläre Esterasen vermittelte Abspaltung von Acetatgruppen führt zur Entstehung fluoreszierender Ester, die stabile Konjugate mit intrazellulären Aminen bilden. Proliferieren diese Zellen, wird das CFSE gleichmäßig auf die Tochterzellen aufgeteilt wodurch die Fluoreszenzintensität pro Zelle im Vergleich zur Ursprungszelle schwächer wird. Dieser Verlust an Fluoreszenzintensität lässt sich durchflusszytometrisch detektieren. Dazu wurden HS/PC pelletiert (5 min, 400 g, 4°C) und in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml in

PBS/5 %FKS resuspendiert. Zu 2 Volumen dieser Suspension wurden nun bei gleichzeitigen Schütteln auf einem Rührschüttler (Vortexer) 1 Volumen einer 2,5 μM CFSE-Lösung gegeben (Endkonzentration ca. 0,83 μM). Anschließend wurden die HS/PC für 5 min im dunkeln bei RT inkubiert und dann unverzüglich 2 mal mit mindestens dem zehnfachen Volumen PBS/5 %FKS gewaschen, um toxische Effekte des überschüssigen CFSE zu verhindern. Ein Teil der CFSE-gefärbten Zellen wurde unverzüglich durchflusszytometrisch analysiert, um einen Ausgangswert der Fluoreszenzintensität von Tag 0 zu haben. Darüber hinaus wurden auch die CD34-Expression und die Vitalität dieser Zellen analysiert. Die restlichen HS/PC wurden für eine Stunde in FKS-freiem Medium entweder MV- oder MOCK-exponiert und nach anschließendem Waschen für 2 bzw. 6 Tage kultiviert. Nach der Kultivierung wurden die Zellen wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben mit anti-CD45-Antikörper und 7AAD gefärbt und dann durchflusszytometrisch bezüglich der CFSE-Signalstärke analysiert.

3.3.4 Durchflusszytometrische Bestimmung der Infektionsrate

Das Genom der beiden rekombinanten MV-Stämme IC323-eGFP und Edmonston-eGFP (ED-eGFP) besitzt ein zusätzliches Gen, das gentechnisch zwischen der 3'-*leader*-Sequenz und dem N-Gen inseriert wurde und die Information für das grünfluoreszierende Protein *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) kodiert. Zellen, die mit einem rekombinanten Virus infiziert sind, exprimieren eGFP, wodurch sie fluoreszierend sichtbar gemacht werden können. Bedingt durch die Position im MV-Genom ist eGFP das häufigste transkribierte Gen und durch die Abhängigkeit von der viralen Polymerase wird es nur gebildet, wenn die Expression virale Proteine stattfindet. Zellen an die das Virus nur gebunden hat, die aber nicht infiziert wurden, oder solche, die mit replikationsdefekten Viren infiziert wurden, produzieren kein eGFP. Zur Ermittlung der Infektionsrate bei HS/PC nach MV-Exposition oder Kokultivierung mit infizierten Lymphozyten wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen (5 min, 400 g, 4°C) und anschließend wie in Kapitel 3.3.1 mit anti-CD34-Antikörpern und 7AAD gefärbt.

3.4 Fluoreszenzmikroskopie

Die Expression von CD150 und CD46 bzw. die Infektion mit eGFP-exprimierenden MV-Stämmen wurde bei Knochenmarksstromazellen fluoreszenzmikroskopisch detektiert. Die Stromazellen wurden wie in Kapitel 3.2.3 in 6-Lochplatten mit einem der eGFP-exprimierenden Stämme infiziert und anschließend kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden fluoreszenzmikroskopisch die Infektion bzw. eGFP-Expression dokumentiert.

Die Immunfärbung der Transmembranproteine fand in sogenannten *Chamberslides* statt. Das sind spezielle Objektträger mit Kammeraufsatz, die für das Wachstum von adhärennten Zellen optimiert sind. Pro Kammer wurden 2×10^4 Stromazellen in 400 μ l Medium ausgesät und über Nacht im Inkubator kultiviert. Als Positivkontrolle wurden 5×10^4 B95a-Zellen pro Kammer ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium abgenommen und die Zellen zur Fixierung mit einer 2 %igen Paraformaldehydlösung (PFA) überschichtet und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen, bevor sie mit einer 0,1 % Triton[®] X-100/PBS-Lösung bedeckt und für 10 min auf Eis gestellt wurden. Nach abermaligem Waschen mit PBS wurde die Zellen zunächst zur Blockierung unspezifischer Bindestellen für 30 min mit 5 % BSA/PBS bei RT inkubiert und anschließend mit einer 1:1000 Antikörper/*Solution 1 for primary Antibodies* (Calbiochem)-Verdünnung bei 4°C über Nacht inkubiert. Für die Detektion von CD150 wurde der monoklonale Antikörper IPO3, für CD46 der monoklonale Antikörper 10/88 und als Isotypkontrolle I14 verwendet. Da all diese Antikörper nicht fluorochromgekoppelt, doch murinen Ursprungs waren, musste die Bindung mit einem sekundären, fluorochromgekoppelten anti-Maus-Antikörper nachgewiesen werden, der spezifisch an das Fc-Fragment der primären Antikörper bindet. Dazu wurde ungebundener Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen mit einer 1:200 anti-Maus-Antikörper/*Solution 2 for secondary Antibodies* (Calbiochem)-Verdünnung für 1 h bei 4°C inkubiert. Durch anschließendes Waschen wurde ungebundener, sekundärer Antikörper entfernt und die Zellkerne durch 5 min Inkubation bei RT im Dunkeln mit einer 1:2000 Verdünnung des Kernfarbstoffs DRAQ5[™] in PBS angefärbt. Abschließend wurde der

Kammeraufsatz entfernt, die Zellen mit ca. 200 μl des Eindeckmediums *Fluoromount G* überschichtet und mit einem Deckgläschen eingedeckt.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Knochenmarksstromazellen wurde mit dem *RNeasy[®] Mini Kit* der Firma Qiagen entsprechend der Anweisungen des Herstellers für tierische Zellen durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurden jeweils Stromazellen desselben Donors aus allen Näpfen einer konfluent bewachsenen 6-Lochplatte mit ATV gelöst, vereinzelt (s. Kapitel 3.1.1) und für die Isolierung eingesetzt. Die isolierte RNA wurde stets in 50 μl H_2O von der Säule eluiert.

3.5.2 Reverse Transkription

Für den Nachweis der Genexpression eines bestimmten Gens wurde zunächst die mRNA aus der isolierten Gesamt-RNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Dabei macht man sich zu Nutze, dass mRNA polyadenyliert ist und sich diese folglich mit oligo-dT-Nukleotiden spezifisch revers primen lassen. Das Enzym Reverse Transkriptase (RT) ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die zusätzlich eine RNaseH-Aktivität besitzt. Während der reversen Transkription entsteht in einem ersten Schritt ein RNA-DNA-Hybrid, dessen RNA-Teil durch die RNaseH-Aktivität abgebaut wird. Der nun einzelne DNA-Strang wird durch die RT zum Doppelstrang aufgefüllt.

Für die Reaktion wurde 1 μg isolierte RNA mit 1 μl oligo-dT-Primern (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zusammen pipettiert und mit RNase-freiem Wasser bis zu einem Volumen von 14 μl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde für 10 min bei 70°C inkubiert, um die RNA zu denaturieren, und anschließend kurz abzentrifugiert. Anschließend wurden je 2 μl 10-fach RT-Puffer und dNTP-Mix, sowie 1 μl RNase-Inhibitor (10 U/ μl) hinzugegeben. Nach einer 2-minütigen Inkubationszeit bei 37°C wurde der Ansatz erneut kurz abzentrifugiert, bevor 1 μl RT (4U/ μl) hinzupipettiert wurden und das Reaktionsgemisch für 1,5 h bei 37°C inkubiert wurde. Die so gewonnene cDNA wurde sofort in

eine anschließende Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) eingesetzt.

3.5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und *nested*-PCR

Bei einer PCR wird durch die zyklische Wiederholung dreier Schritte eine spezifische DNA-Sequenz mittels einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase amplifiziert. Da die Polymerase nur an bereits an die DNA gebundenen Oligonukleotiden (Primer) mit der Replikation beginnen kann, kann die zu amplifizierende Sequenz durch die Auswahl zweier spezifischer Primer (je ein Primer pro DNA-Einzelstrang) bestimmt werden. Die drei Schritte einer PCR sind:

- Denaturierung des DNA-Doppelstrangs bei 95°C
- Anlagerung der Primer an den DNA-Einzelstrang durch Herabsetzen der Temperatur (*annealing*)
- Synthese des komplementären Strangs durch die Polymerase (Elongation)

Nach einer initialen 5minütigen Denaturierung bei 95°C wird durch Abkühlung die Hybridisierung der im Überschuss vorliegenden Primer mit der nun einzelsträngigen DNA ermöglicht. Anschließend wird die Temperatur auf 72°C eingestellt, was dem Temperaturoptimum der Polymerase entspricht. Die Polymerase beginnt nun mit der Synthese des komplementären Strangs. Anschließend beginnt ein neuer Zyklus mit der Denaturierung der DNA. So wird bei jedem Zyklus die Menge der vorhandenen DNA bzw. des Abschnitts zwischen den beiden Primern verdoppelt. Im Anschluss an die Zyklen wird das Reaktionsgemisch abschließend für 10min bei 72°C inkubiert, um die vollständige Elongation zu gewährleisten. Das entstandene PCR-Produkt kann nun bei 4°C bis zur gelelektrophoretischen Analyse gelagert werden.

Wird erwartet, dass die zu amplifizierende DNA im Ausgangsmaterial nur in geringer Menge vorkommt, wird im Anschluss an die PCR eine *nested*-PCR angeschlossen. Hierbei wird das Produkt aus der PCR in einer erneuten PCR eingesetzt. Bei der zweiten PCR werden Primer benutzt die innerhalb des ersten PCR-Amplifikats hybridisieren, wodurch bei der zweiten PCR ein etwas kürzeres Produkt entsteht.

Alle PCR in dieser Arbeit wurden mit *pureTaqReady-To-Go PCR-Beads* durchgeführt. Diese Kügelchen enthielten dATP, dCTP, dGTP, dTTP, BSA (je 200 µM in 10 mM Tris-HCl), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 10fach Reaktionspuffer und 2,5 Units pureTaq DNA-Polymerase. Nachdem die Kügelchen in 21 µl HPLC-gereinigtem Wasser aufgelöst wurden, kamen je 1 µl der beiden benötigten Primer (33pmol) und 2 µl cDNA bzw. bei der nested-PCR 2 µl DNA aus der vorgeschalteten PCR hinzu.

Im *PTC-200 Thermo Cycler* der Firma Bio-Rad wurden die Reaktionen nach folgenden Programmen durchgeführt:

<u>CD46-PCR</u>	<u>CD150-PCR</u>	<u>CD150-nested PCR</u>
95°C 5min	95°C 5min	95°C 5min
95°C 30s	95°C 30s	95°C 30s
65°C 1min	58°C 30s	51°C 30s
72°C 1min	72°C 1min	72°C 1min
72°C 10min	72°C 10min	72°C 10min
45 Zyklen	40 Zyklen	35 Zyklen

Die Schritte 2 - 4 einer jeden PCR wurden zyklisch wiederholt, bevor die PCR mit dem finalen Elongationsschritt endete.

3.5.4 Agarosegelelektrophorese

Wurde das zu analysierende Gen von den Stromazellen exprimiert, lag folglich mRNA in der Zelle vor, die durch die reverse Transkription und anschließender PCR in DNA umgeschrieben und amplifiziert wurde. Dabei entstehen DNA-Doppelstränge definierter Größe, die durch die Position, an der die beiden Primer innerhalb der Sequenz hybridisieren, bestimmt wird. Das Wissen um die Größe wird genutzt, um den Erfolg der PCR gelelektrophoretisch zu überprüfen. Bei der Agarosegelelektrophorese wird DNA mittels elektrischer Spannung durch ein Gel geführt, das aus polymerisierter Agarose besteht. Da die Poren des Gels die Migration von größeren DNA-Molekülen entlang des elektrischen Feldes stärker

behindern als von Kleineren, kommt es zur Auftrennung eines DNA-Molekülgemischs bezüglich der Größe. Mittels eines gleichzeitig laufenden Größenstandards, einem Gemisch aus DNA-Molekülen definierter Länge, lässt sich die Größe des zu analysierenden PCR-Produkts bestimmen. Im Gel befindet sich zusätzlich Ethidiumbromid, ein fluoreszierender Stoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert. Dadurch kann im Anschluss an die Gelelektrophorese die DNA im Gel durch Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Die entstandenen PCR-Produkte wurden in 1 %igen Agarosegelen bei 80 - 100 Volt für 30 bis 60 min aufgetrennt. Dazu wurde 0,5 g Agarose in 50 ml TAE-Puffer unter Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und anschließend mit 4 µl einer 1 %igen Ethidiumbromidlösung versetzt. In einen Gelschlitten wurde das Gemisch zur Polymerisation gegossen und am oberen Ende ein Kamm eingesteckt, wodurch im ausgehärteten Gel Taschen entstanden, in die später die DNA-Proben pipettiert werden. Je 5 µl der PCR-Produkte wurden mit 1 µl 6fach Ladepuffer vermischt und in die Taschen gegeben. Zusätzlich wurde in eine Tasche 5 µl Größenstandard gegeben. Nach der Auftrennung wurde die Größe des entstandenen PCR Produkts an einem UV-Tisch dokumentiert.

3.6 Proteinbiochemische Methoden

3.6.1 Aufreinigung monoklonaler Antikörper

Die zur Gewinnung monoklonaler Antikörper benutzten Hybridomzellen wurden in RPMI 1640/10 % FKS im Inkubator kultiviert und die Überstände wöchentlich gesammelt und bei 4°C gelagert, bis ca. 0,5 l Überstand zur Verfügung stand. Aus dem Überstand wurde mittels Affinitätschromatographie über Protein G-Säulen der von den Hybridomzellen sezernierte Antikörper aufgereinigt.

Die Aufreinigung des monoklonalen Antikörpers aus dem Überstand fand im 4°C-Raum statt. Zunächst wurde der Überstand zentrifugiert (15 min, 100 g, 4°C), um ihn von Zelldebris zu befreien und mittels Passage durch einen Filter mit 0,2 µm Porengröße sterilisiert. Die Proteine G-Säule wurde durch zweimaliges, 20minütiges Durchlaufen des Bindungspuffers A equilibriert. Dann wurde der Überstand mit einer Pumpe zirkulär über Nacht durch die Säule laufen gelassen. Am darauf folgenden

Tag wurde die Säule wieder mit Bindungspuffer A beladen. Nachdem der Puffer durchgelaufen war, wurden die an das Protein G gebundenen Antikörper mit einem sauren Elutionspuffer von der Säule gelöst. In Reagenzgläsern, in die jeweils 500 µl 1 M Tris (pH 8,9) vorgelegt war, wurden jeweils 5 ml Eluat aufgefangen. Die eluierten 5 ml Antikörperlösung wurde sofort durch Schütteln mit der basischen Trislösung vermischt, um den für die Antikörper schädlichen sauren pH zu neutralisieren. In Dialyseschläuchen wurde die Antikörperlösung über Nacht gegen 5 l PBS dialysiert. Die dialysierte Lösung wurde anschließend aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Proteinmenge der Lösung wurde später photometrisch bestimmt.

3.6.2 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung wurde der Bicinchoninsäuretest (BCA) durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird die Reduktion zweiwertiger Kupferionen zu einwertigen durch Proteine für die Analyse genutzt. Die entstandenen einwertigen Kupferionen werden durch Bicinchoninsäure komplexiert, wodurch sich die Lösung violett färbt. Die Komplexe weisen eine maximale Absorption bei 562 nm auf und der Grad der Lichtabsorption durch eine Lösung verhält sich direkt proportional zur ihrer Proteinkonzentration. Durch den Vergleich mit einer Proteinstandardlösung, lässt sich somit die Konzentration einer Lösung ermitteln.

Zur Bestimmung wurde zunächst 1:50 Verdünnung von Kupfer-II-Lösung in Bicinchoninsäure hergestellt. Mit je 2 ml dieser Lösung wurden je 10 µl einer Standardproteinlösung (1 mg/ml), PBS (Nullwert) und der zu untersuchenden Proben vermischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen zum Abkühlen für 5 - 10 min auf Eis gestellt und dann mit den entsprechend eingegebenen Parametern am Photometer gemessen. Aus der Extinktion ergab sich nach folgender Formel die Proteinkonzentration der Lösung:

$$\frac{\text{Extinktion der Probe}}{\text{Extinktion des Standards}} \times \text{Konzentration des Standards} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Konzentration} \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

3.7 Tierversuche

Die in dieser Arbeit beschriebenen Tierversuche wurden in Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Albrecht Müller (Zentrum für experimentelle molekulare Medizin (ZEMM)) durchgeführt. Dabei übernahmen die Mitarbeiter des ZEMM die Bestrahlung der Mäuse, die Injektion der zu transplantierenden HS/PC und die Haltung und Pflege der Mäuse. Die verwendeten Mäuse stammten aus der Zucht des ZEMM und wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Müller zur Verfügung gestellt. Hierbei handelte es sich um NOD/SCID-IL2R γ ^{-/-}-Mäuse aus der Kolonie NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ.v.

3.7.1 Xenotransplantation

Immunsupprimierte Mäuse, wie NOD/SCID-IL2R γ ^{-/-}-Mäuse, wurden benutzt, um das Rekonstitutionspotentials von HS/PC nachzuweisen. Dazu wurden die Mäuse am Tag des Experiments zunächst mit 2,5 Gy ionisierender Strahlung behandelt, wodurch ein Großteil der eigenen HS/PC im Knochenmark abgetötet wird. Dies ist notwendig, um in der Nische Platz zu schaffen für die zu transplantierenden, humanen HS/PC. Die HS/PC wurden nach der Isolierung (s. Kapitel 3.1.2) für 1 h mit MV (M.O.I. 5) oder dem entsprechenden Volumen MOCK bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen (10 min, 400 g, RT) und letztlich in PBS so resuspendiert, dass die Anzahl zu transplantierender Zellen in 300 μ l PBS vorlag, und auf Eis gestellt. Die Anzahl transplanteder Zellen variierte je nach Experiment und Verfügbarkeit und ist in Kapitel 4 angegeben. Den bestrahlten Mäusen wurden 300 μ l HS/PC-Suspension in die Schwanzvene injiziert, bevor sie dann 40 h, 7 Tage oder 12-13 Wochen im Tierstall des ZEMM gehalten wurden. Während dieser Zeit bekamen die Mäuse über das Trinkwasser das Antibiotikum Baytril, das in einer Konzentration von 0,5 mg/ml im Wasser gelöst war.

3.7.2 Organentnahme

Nach der angegebenen Zeitspanne wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation (Genickbruch) getötet und mit vier Nadeln auf dem Rücken liegend an den äußersten Extremitäten auf einer Styroporplatte fixiert. Das Thorax der Maus wurde mit einem Schnitt entlang der Linea alba und zusätzlichen Entlastungsschnitten an der

seitlichen Brustwand offen gelegt. Die unter dem Magen liegende Milz wurde nun mit einer Pinzette angehoben und mit einigen Scherenschnitten aus dem Thorax gelöst. Bis zur weiteren Präparation wurde die Milz in 0,3 %BSA/PBS aufbewahrt. Anschließend wurden das Fell und die Muskelstränge, die den Femur umgeben mit der Schere herausgetrennt. Der nun offen liegende Femur wurde durch Schnitte oberhalb des Kniegelenks und unterhalb des Hüftgelenks entnommen und in 0,3 % BSA/PBS gelagert. Mit Schnitten oberhalb des Sprunggelenks und unterhalb des Kniegelenks wurde die Tibia gelöst und mit dem Femur zusammen gelagert. Femur und Tibia wurde aus beiden Hinterextremitäten präpariert.

3.7.3 Herstellung von Einzelzellsuspensionen der Organe

Für die durchflusszytometrische Analyse der Organzellen wurden aus der Milz und dem Knochenmark Einzelzellsuspensionen hergestellt. Dazu wurde die Milz in einen Filter mit 70µm Porengröße gelegt, der auf einem 50ml-Röhrchen plaziert wurde. Die Zellen der Milz wurde nun mechanisch durch Zerreiben mit dem Kolben einer 5 ml-Spritze vereinzelt. Mit 0,3 % BSA/PBS wurden die Einzelzellen durch den Filter in das 50 ml-Röhrchen gespült.

Femur und Tibia wurden mit einer Pinzette über ein geöffnetes 50ml-Röhrchen gehalten und mit einer Spritze, die 0,3 % BSA/PBS enthielt, durchgespült, sodass das Knochenmark in das Röhrchen fiel. Waren alle vier Knochen ausgespült, wurde das Knochenmark durch starkes Schütteln auf einem *Vortexer* vereinzelt.

Die Einzelzellsuspensionen der beiden Organe wurden nun zweimal mit je 25 ml 0,3 % BSA/PBS gewaschen (10 min, 400 g, RT). Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 2-5 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 1 ml FKS mit einer Pasteurpipette unter den Erythrozytenlysepuffer in das Röhrchen pipettiert, sodass zwei Schichten entstanden. Dann wurden die Zellen pelletiert (10 min. 400 g, RT), bevor der Überstand komplett entnommen und die Zellen in 1 - 2 ml FACS-Puffer resuspendiert wurden. Die so behandelten Zellen standen nun für die durchflusszytometrische Analyse zur Verfügung.

4 Ergebnisse

4.1 Phänotypisierung von HS/PC

Die drei Mitglieder der SLAM-Familie CD150, CD244 und CD48 werden während der murinen Hämatopoese von Zellen unterschiedlichen Entwicklungsstadiums exprimiert. Murine HS/PC, die sich durch den Phänotypen $c\text{-KIT}^+/\text{Sca-1}^+/\text{Lin}^-$ (KSL) auszeichnen, können anhand des Expressionsmusters dieser drei SLAM-Proteine in $\text{KSL-CD150}^+/\text{CD244}^-/\text{CD48}^-$ Stammzellen, $\text{KSL-CD150}^-/\text{CD244}^+/\text{CD48}^-$ multipotente Vorläuferzellen und $\text{KSL-CD150}^-/\text{CD244}^+/\text{CD48}^+$ oligopotente Vorläuferzellen eingeteilt werden (Kiel et al, 2005). Humane HS/PC, die immunomagnetisch aus UCB bzw. peripherem Blut mobilisierter Patienten mit myeloider Leukämie mittels anti-CD34-gekoppelten Magnetpartikel (*CD34-beads*) isoliert wurden, wurden durchflusszytometrisch phänotypisiert, um zu ermitteln, ob das als *SLAM-code* bezeichnete Expressionsmuster auch während der humanen Hämatopoese Anwendung findet. Bei der Aufreinigung der CD34^+ HS/PC konnten Reinheiten von ca. 75-99 % erzielt werden. Diese wurde durchflusszytometrisch nach Färbung eines Teils der Zellen mit fluorchromgekoppelten Antikörpern gegen CD45 und CD34 und dem Tot/Lebendfarbstoff 7AAD ermittelt. Der Grad der Reinheit ergibt sich aus der Relation von lebenden CD34^+ -Zellen zu lebenden CD45^+ -Lymphozyten (Abb.:4.1). Die in den folgenden Kapiteln beschriebenen Phänotypisierungen wurden sowohl mit HS/PC aus UCB als auch aus peripherem Blut GM-CSF-mobilisierter Leukämiepatienten durchgeführt. Bezüglich der untersuchten Oberflächenmarker wurde jedoch kein Unterschied im Expressionsmuster zwischen den beiden Ausgangsmaterialien entdeckt, so dass im Folgenden nicht zwischen ihnen unterschieden wird.

4.1.1 HS/PC exprimieren die SLAM-Marker

CD244 wird von fast allen humanen HS/PC exprimiert. Im Durchschnitt wurde bei 89,15 % der HS/PC CD244 auf der Oberfläche detektiert. Die Werte lagen in einem Bereich von 75,6-98,96 % (n=16) (Tab.: 4.1; Bsp. in Abb.: 4.2 a untere Reihe, rechtes Bild). Bei solch hohen Werten kann man davon ausgehen, dass alle HS/PC CD244 exprimieren. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der CD244^+ HS/PC war im Durchschnitt um den Faktor 4,52 ($\pm 1,79$) gegenüber den CD244^- HS/PC erhöht.

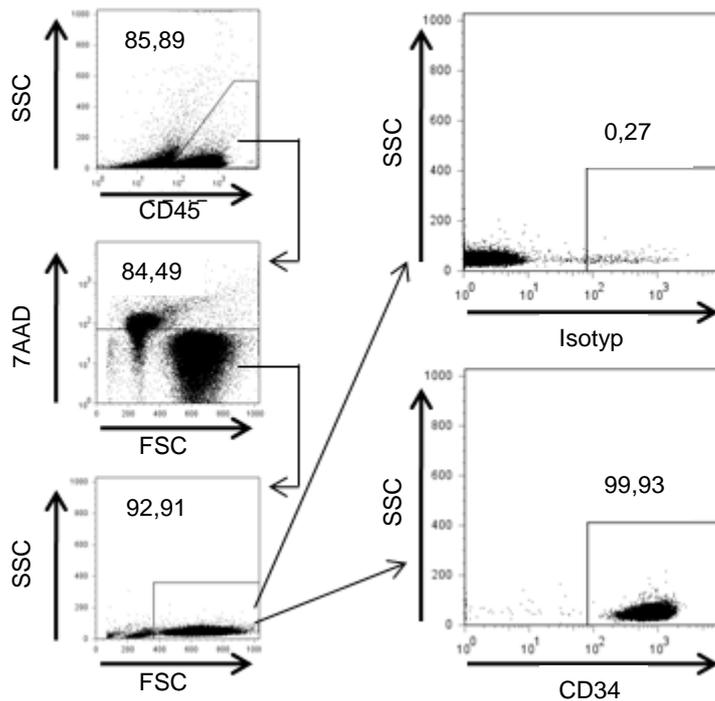


Abb. 4.1: HS/PC-Reinheit

Die Reinheit der aufgereinigten HS/PC wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Es wurden mindestens 5×10^4 Ereignisse detektiert. Aus diesen wurden zunächst CD45-positive Leukozyten ausgewählt, von denen wiederum die Lebenden, also 7AAD-negativen, weiter analysiert wurden. Alle lebenden Leukozyten, die im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht ein für Lymphozyten typisches Signal gaben, wurden auf ihre Oberflächenexpression von CD34 hin analysiert. Als Isotypkontrolle zur CD34-Färbung diente ein PE-konjugierter, muriner IgG2a Antikörper.

Der Marker CD48, der im murinen System ausschließlich von oligopotenten Vorläuferzellen exprimiert wird, wurde im humanen HS/PC-Kompartiment von einer kleinen Subpopulation exprimiert (im Durchschnitt 2,42 %, die Werte bewegten sich in einem Bereich von 0,64-4,5 %) (n=25) (Tab.: 4.1; Bsp. in Abb.: 4.2 a untere Reihe, mittleres Bild). Die MFI dieser Subpopulation war gegenüber den restlichen HS/PC im Durchschnitt um Faktor 16,53 ($\pm 14,18$) erhöht.

Der dritte Marker des SLAM-codes, CD150, wird ebenfalls von einer kleinen Subpopulation exprimiert. Diese Subpopulation von CD34⁺/CD150⁺-Zellen wurde bei allen untersuchten Präparaten (n=72) detektiert. Im Durchschnitt exprimieren 5,53 % der HS/PC CD150 und die Werte erstreckten sich über einen Bereich von 0,5-25,8 % (Tab.: 4.1; Bsp. Abb.: 4.2 a untere Reihe, rechtes Bild). Die Subpopulation wies im Durchschnitt eine Steigerung der MFI um Faktor 21,27 ($\pm 10,93$) auf. Die Expression von CD150 durch humane HS/PC und die Größe der CD48⁺-Subpopulation wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Da neben CD34 aber auch CD133 als Antigen für eine immunomagnetische Aufreinigung von humanen HS/PC standardmäßig eingesetzt wird, beide Populationen aber nicht vollständig identisch sind, wurde

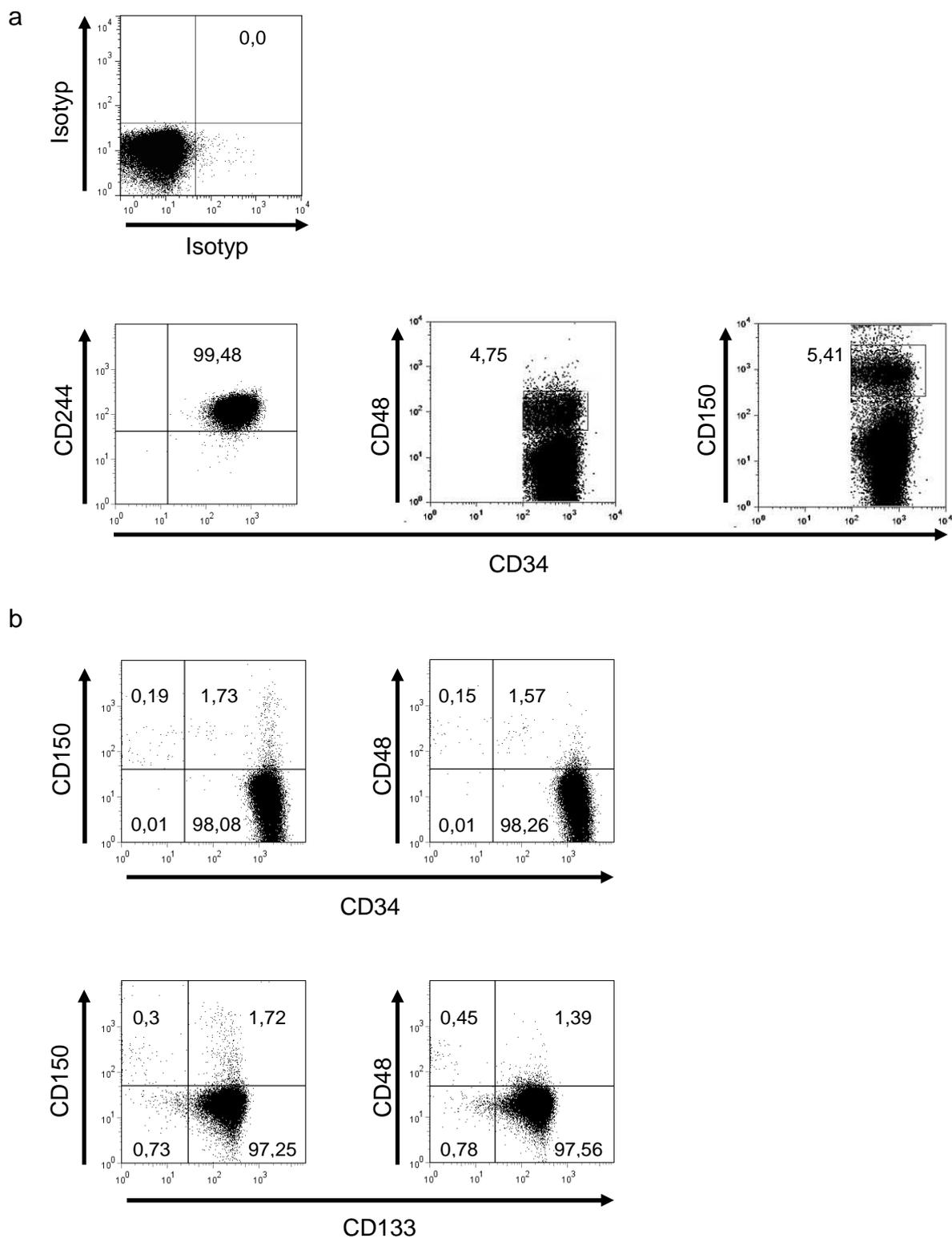


Abb. 4.2: Expression von SLAM-code-Markern

Die Oberflächenexpression der drei SLAM-Marker CD150, CD48 und CD244 wurde auf humanen HS/PC nach Anreicherung mittels anti-CD34 Antikörper, die mit Magnetpartikel konjugiert waren, durchflusszytometrisch analysiert. a) Repräsentative Messung der drei Marker und Isotypkontrolle auf CD34⁺-HS/PC. b) Zellen derselben Probe wurden entweder mit anti-CD34 oder mit anti-CD133 und zusätzlich entweder mit anti-CD150 oder anti-CD48 markiert.

	CD150 (n=72)	CD48 (n=25)	CD244 (n=16)	CD46 (n=9)
Median	3,28	1,43	89,95	98,94
Bereich	0,5-25,8	0,64-4,5	75,6-98,96	95,43-99,93
Mittelwert	5,53	2,42	89,15	98,39

Tab. 4.1: Oberflächenexpression auf HS/PC

Der prozentuale Anteil der CD34⁺-HS/PC, die den jeweiligen Marker auf ihrer Oberfläche exprimieren, wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Die untersuchten HS/PC stammten aus 54 Nabelschnurblutproben und 18 Leukaphereseprodukten von Leukämiepatienten, die ursprünglich für eine autologe Stammzelltransplantation vorgesehen waren.

überprüft, ob CD150 und CD48 auch von CD133⁺-Zellen exprimiert werden. Beide SLAM-Proteine konnten durchflusszytometrisch auf CD133⁺-Zellen nachgewiesen werden (Bsp. in Abb.: 4.2 b). Die Größen der jeweiligen Subpopulationen unterschieden sich nicht von einander, unabhängig davon ob nun CD34 oder CD133 zur Markierung von HS/PC verwendet wurde. Die MFI war um den Faktor 11,43 (\pm 3,86) für CD150 und 3,89 (\pm 0,91) gestiegen.

4.1.2 Subpopulationen humaner HS/PC lassen sich nicht aufgrund des SLAM-codes definieren

Der Befund, dass offensichtlich alle HS/PC CD244 exprimieren, lässt bereits darauf schließen, dass der murine SLAM-code nicht auf die humane Hämatopoese anwendbar ist. Eine Koexpression von CD244 und CD150, wie sie von den Ergebnissen der Phänotypisierung abgeleitet werden kann, ist bei murinen HS/PC nicht nachweisbar. Um diesen Verdacht zu erhärten, wurde die Koexpression von CD150 und CD244 auf humanen HS/PC untersucht. Wie erwartet zeigte sich, dass

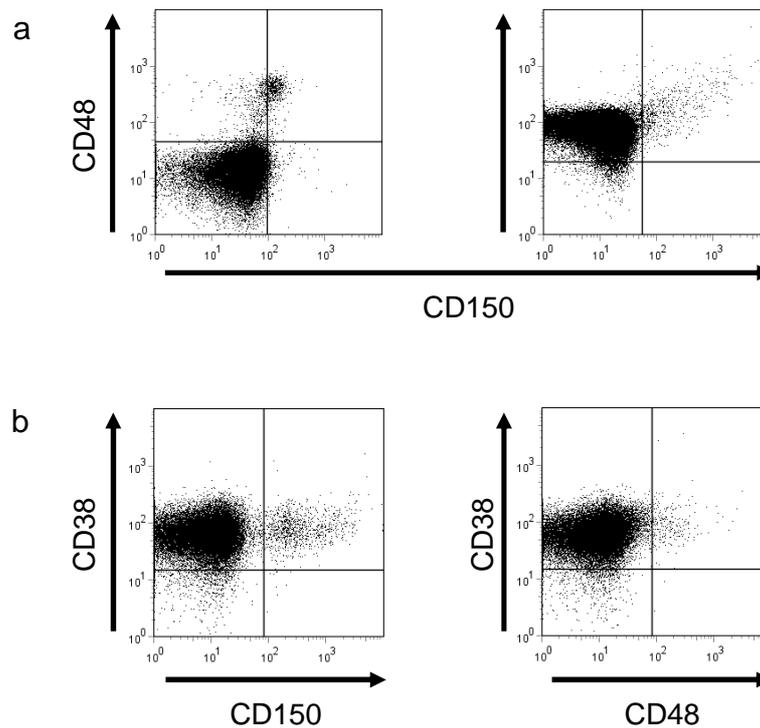


Abb. 4.3: SLAM-code bei humanen HS/PC

Humane CD34⁺-HS/PC wurden durchflusszytometrisch auf die Anwendbarkeit des SLAM-codes hin untersucht. Die Zellen wurden mit anti-CD34-Antikörpern und je zwei weiteren Antikörpern markiert. Gezeigt wird die Expression der jeweils angegebenen Marker auf den zuvor als CD34⁺ detektierten Zellen. a) Repräsentative Messung der Koexpression von CD48 und CD150 bzw. CD244 und CD150 auf humanen HS/PC. b) Repräsentative Messung der Koexpression von CD38 und CD150 bzw. CD48 auf humanen HS/PC. a+b) Gezeigt werden je 1 von 3 unabhängigen Messungen.

alle CD150⁺-Zellen auch CD244 exprimieren (Bsp. in Abb.: 4.3 a rechtes Bild). Eine weitere Kombination, die der SLAM-code nicht zulässt, ist die Koexpression von CD150 und CD48. Im Gegenteil, hierbei handelt es sich um die beiden SLAM-Marker, die von den zwei KSL-Zelltypen exprimiert werden, die bezüglich ihres Entwicklungsstadiums am weitesten voneinander entfernt sind. Im humanen HS/PC-Kompartiment konnten hingegen Zellen nachgewiesen werden, die beide SLAM-Marker koexprimieren (Bsp. in Abb.: 4.3 a linkes Bild). Somit ist belegt, dass zwar alle drei SLAM-code-Marker auch von humanen HS/PC exprimiert werden, der SLAM-code, wie er in der murinen Hämatopoese auftritt, jedoch nicht auf das humane System übertragen werden kann. Zwar findet der SLAM-code bei humanen

HS/PC keine Anwendung, doch stellte sich trotzdem die Frage, ob die Expression der beiden SLAM-Marker $CD48^+$ und $CD150^+$ für eine Unterscheidung von humanen Stamm- oder Vorläuferzellen herangezogen werden kann. Humane HSC sind hoch angereichert in der $CD34^+/CD38^-$ Subpopulation, während man HPC hauptsächlich im $CD34^+/CD38^+$ -Kompartiment vorfindet. Um zu überprüfen, ob es sich bei den detektierten SLAM-Subpopulationen um HSC oder HPC handelt, wurde die Koexpression der SLAM-Marker mit CD38 untersucht. Beide SLAM-Marker, CD150 und CD48, wurden von den analysierten $CD34^+$ -Zellen mit CD38 koexprimiert (Bsp. in Abb.: 4.3 b). Dies lässt den Schluss zu, dass sowohl CD150 als auch CD48 Marker für humane HPC darstellen.

4.2 Differenzierungspotential der $CD34^+/CD150^+$ -HPC

Da das Transmembranprotein CD150 nicht nur einen Marker für murine HSC darstellt, sondern auch als Rezeptor für das MV fungiert, kommt der $CD34^+/CD150^+$ -Subpopulation besondere Aufmerksamkeit zu. Nach der phänotypischen Identifizierung, sollten funktionelle Analysen zeigen, ob sich diese Subpopulation von den $CD150^-$ -HS/PC bezüglich ihres Differenzierungspotentials unterscheidet.

4.2.1 $CD34^+/CD150^+$ - und $CD34^+/CD150^-$ -Zellen differenzieren gleichermaßen *in vitro*

Zunächst wurde das Differenzierungspotential dieser Subpopulation *in vitro* im Kolonienwachstumsexperiment (colony forming assay (CFA)) ermittelt. Hierbei wurden je 400 $CD34^+$ -Zellen, die aus Nabelschnurblut aufgereinigt und anschließend durchflusszytometrisch in eine $CD150^+$ - und eine $CD150^-$ -Fraktion aufgetrennt wurden, in einem methylzellulosehaltigem Medium ausgesät und 14 Tage bei $37^\circ\text{C}/5\%$ CO_2 inkubiert. Dieses Medium enthielt die Zytokine SCF, GM-CSF, IL-3 und EPO, die es den ausgesäten HPC erlauben zu proliferieren und zu myeloiden Vorläuferzellen zu differenzieren. Durch die semisolid Konsistenz der Methylzellulose bei 37°C können sich teilende Zellen nicht voneinander entfernen, was über 14 Tage hinweg zur Bildung von Kolonien führt, die dann bestimmt und ausgezählt werden können. HSC können in dieser kurzen Inkubationszeit nicht zur Koloniebildung beitragen. Bei der Auszählung wurde zwischen Kolonien erythroider

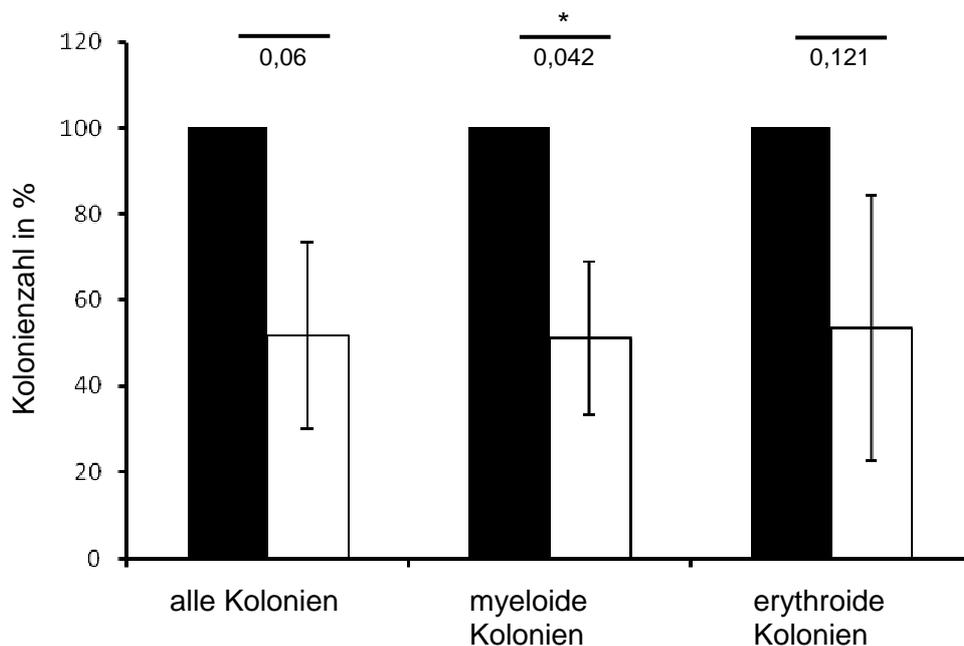


Abb. 4.4: Kolonienwachstum von CD150⁻- und CD150⁺-HS/PC

Humane HS/PC wurden durchflusszytometrisch in eine CD34⁺/CD150⁻-Fraktion (schwarze Balken) und eine CD34⁺/CD150⁺-Fraktion (weiße Balken) sortiert. Von beiden Fraktionen wurden je 400 Zellen in 1ml Methylzellulosemedium ausgesät und bei 37°C kultiviert. Die Kolonienzahl wurde nach 14 Tagen inkubation bestimmt und die jeweilige Kolonienzahl, die von der CD34⁺/CD150⁻-Fraktion gebildet wurde als 100% gesetzt. Jeder CFA wurde im Dreifachansatz durchgeführt. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen (Fehlerbalken) von drei unabhängigen Experimenten.

Vorläuferzellen (bulk forming units-Erythrocyte; BFU-E bzw. colony forming unit-Erythrocyte; CFU-E), und den Kolonien aus anderen myeloiden Vorläuferzellen, unterschieden. Die myeloiden Kolonien bestehen entweder aus granulozytären-makrophagen Vorläuferzellen (CFU-GM), granulozytären Vorläuferzellen (CFU-G), makrophagen Vorläuferzellen (CFU-M) oder aus multipotenten granulozytären, erythroiden, monozytären und megakaryozytären Vorläuferzellen (CFU-GEMM). Beide Fraktionen, sowohl CD150⁺- als auch CD150⁻-humane CD34⁺-Zellen entwickelten sich im CFA zu myeloiden und erythroiden Kolonien (Abb.:4.4). Normalisiert man die Werte der drei unabhängigen Experimente, die jeweils im Dreifachansatz durchgeführt wurden, indem man die Kolonienzahl der jeweiligen CD34⁺/CD150⁻-Population als 100 % nimmt, zeigt sich eine durchschnittlich geringere Anzahl an Kolonien bei den ausgesäten CD34⁺/CD150⁺-Zellen. Betrachtet man die Gesamtzahl der Kolonien, so bilden CD34⁺/CD150⁺-Zellen nur 51,67 % so

viele Kolonien wie die CD34⁺/CD150⁻-Zellen. Mit einem p-Wert von 0,0604 ist dieser Unterschied jedoch statistisch nicht signifikant. Auch der Unterschied bei der Anzahl der erythroiden Kolonien, CD34⁺/CD150⁺-Zellen bilden 46,45 % weniger, ist mit einem p-Wert von 0,1212 statistisch nicht signifikant. Der einzige signifikante Unterschied lässt sich bei der Anzahl der myeloiden Kolonien errechnen. CD34⁺/CD150⁺-Zellen bildeten 48,93 % weniger myeloide Kolonien aus. Für diese Differenz wurde ein p-Wert von 0,042 errechnet.

4.2.1 Beide Subpopulationen differenzieren zu Lymphozyten *in vivo*

Die Ergebnisse des CFA zeigen zwar, dass beide Fraktionen, CD150⁺ und CD150⁻, in myeloide und erythroide Vorläuferzellen differenzieren können, sagen aber nichts über das Differenzierungspotential bezüglich der lymphoiden Linie aus. Des Weiteren ist der *in vitro*-Versuch zwar ein nützliches Mittel, doch spiegelt er die Komplexität der Hämatopoese *in vivo* nur sehr unzureichend wieder. Besonders die Interaktion zwischen der Nische der HS/PC im Knochenmark und den HS/PC findet kaum Berücksichtigung. Eine Methode die humane Hämatopoese im Experiment naturgetreuer zu untersuchen bietet eine Xenotransplantation humaner HS/PC. Bei diesem Transplantationsexperiment kann darüber hinaus auch die Differenzierung in lymphoide Zellen untersucht werden. Im Zuge der Transplantationsexperimente wurden Zellen aus der jeweiligen Fraktion in die Schwanzvene subletal gammabestrahelter NOD/SCID-IL2R γ ^{-/-}-Mäuse injiziert. Da die Mäuse kein funktionierendes adaptives Immunsystem besitzen und auch die Funktion von Makrophagen und dendritischen Zellen gestört ist, werden sie für Xenotransplantationen benutzt (Ishikawa et al, 2005). Die humanen HS/PC migrieren nach Injektion ins periphere Blut zu den lymphatischen Organen, vor allem ins Knochenmark, wo sich ihre Nische befindet (Dar et al, 2006). Dort angekommen sind sie in der Lage die Maus zu rekonstituieren, d.h. Hämatopoese zu etablieren. HSC werden durch ihre Fähigkeit der Langzeitrekonstitution definiert, während 12 Wochen nach Transplantation mit HPC nur noch ein geringer Anteil der Leukozyten (CD45⁺) in der Maus humanen Ursprungs sind. In zwei Experimenten wurden je einer Maus 3x10⁴ bzw. 1,5x10⁴ CD34⁺/CD150⁻ bzw. CD34⁺/CD150⁺-Zellen injiziert. Nach 12 Wochen wurden die Milz und das Knochenmark präpariert und der Anteil humaner Leukozyten durchflusszytometrisch in beiden Organen bestimmt. Zusätzlich wurde

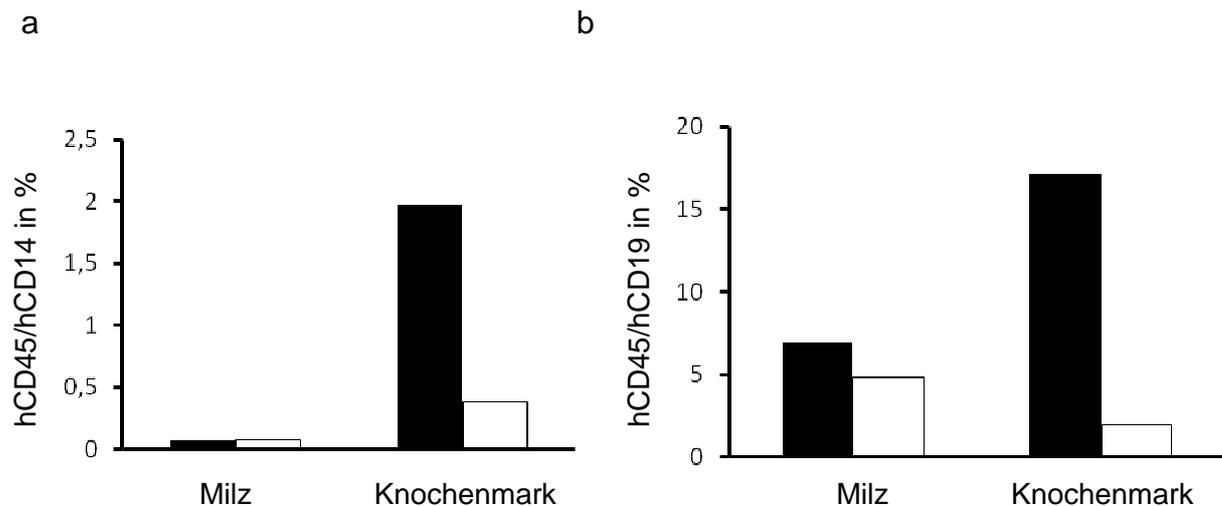


Abb. 4.5: Rekonstitution bestrahlter NOD/SCID-Mäuse durch CD150⁺- bzw. CD150⁻ HS/PC

NOD/SCID-Mäusen wurde nach Bestrahlung mit einer Intensität von 2,5Gy entweder CD34⁺/CD150⁻-HS/PC (schwarze Balken) oder CD34⁺/CD150⁺-HS/PC (weiße Balken) in die Schwanzvene injiziert. 12 Wochen nach der Transplantation wurden jeweils die Milz und das Knochenmark präpariert und der Anteil an humanen Zellen durchflusszytometrisch ermittelt. a) Humane, myeloide Zellen in den beiden lymphatischen Organen wurden mittels Immunfärbung mit anti-CD45- und anti CD14-Antikörper nachgewiesen. b) Humane, lymphoide Zellen in den beiden lymphatischen Organen wurden mittels Immunfärbung mit anti-CD45- und anti CD19-Antikörper nachgewiesen. a+b) Ergebnisse eines von zwei Experimenten.

bestimmt, ob sich humane Zellen der lymphoiden und myeloide Linie entwickelt hatten. Dazu wurde die Oberflächenexpression von CD19 (lymphoide Linie) und CD14 (myeloide Linie) gemessen. Beide Zellfraktionen waren in der Lage, in beide Linien zu differenzieren (Abb.: 4.5). Auffällig war, dass besonders im Knochenmark der Anteil humaner Zellen bei den Mäusen, die mit CD34⁺/CD150⁺-Zellen transplantiert wurden, geringer war. Eine statistische Auswertung dieses Unterschiedes konnte zwar aufgrund der Anzahl der Experimente (n=2) nicht durchgeführt werden, jedoch passt dieser Befund gut zur vorherigen Phänotypisierung der CD34⁺/CD150⁺-Zellen als HPC.

4.3 Infektion von HS/PC mit MV

Im Gegensatz zum wildtypischen MV, das ausschließlich CD150 als bekannten Rezeptor besitzt, ist das attenuierte MV in der Lage Zellen zusätzlich auch via CD46 zu infizieren (Yanagi et al, 2006). CD46 wird als Teil des Komplementsystems von allen kernhaltigen Zellen exprimiert, so auch von humanen HS/PC (Liszewski et al,

1991). Im Durchschnitt wurden 98,39 % ($\pm 1,56$) der HS/PC im Durchflusszytometer positiv auf CD46 getestet, mit einer durchschnittlichen Erhöhung der MFI um Faktor 6,26 ($\pm 1,94$). (Tab.: 4.1, Bsp.: Abb.: 4.6 a rechtes Bild). Da im Gegensatz dazu nur ein geringer Prozentsatz der HS/PC CD150 exprimiert (Tab.: 4.1, Beispiel in Abb.: 4.6 a mittleres Bild), wurde die Infektionsrate bei HS/PC mit einem eGFP-exprimierendem wildtypischem bzw. attenuiertem Virus durchflusszytometrisch ermittelt. Zwei Tage nach Infektion waren im Durchschnitt 61.65 % (Faktor der MFI-Steigerung im Mittel: 68,55 ($\pm 43,92$)) der HS/PC mit dem attenuierten ED-eGFP und 4.02 % (Faktor der MFI-Steigerung im Mittel: 143,27 ($\pm 126,75$)) mit dem wildtypischen IC323-eGFP-Stamm infiziert (Bsp.: Abb. 4.6 b). Dieser Unterschied ist mit einem p-Wert von 0,001 statistisch höchst signifikant. Die Infektionsraten mit dem wildtypischen IC323-eGFP waren so gering, dass die Annahme, dass nur die CD150⁺-HS/PC infiziert wurden, nahe lag. Andererseits ist vom wildtypischen MV auch bekannt, dass es zu einem geringen Prozentsatz auch CD150⁻-Zellen, wie z.B. Endothelzellen, infizieren kann (Hashimoto et al, 2002). Um die Rezeptor-abhängigkeit der Infektion bei HS/PC genauer zu untersuchen wurden diese wie beschrieben bezüglich ihrer CD150-Expression fraktioniert und die Fraktionen für 1h bei 37°C dem wildtypischen IC323-eGFP ausgesetzt. Da die Anzahl an CD150⁺-HPC nach der Aufreinigung zu gering war, um anschließende durchflusszytometrische Analysen durchzuführen, wurden die Zellen im CFA eingesetzt. Nach 14 Tagen Kultivierung waren die entstandenen Kolonien zwar selbst nicht eGFP-positiv, aber zum Teil von kleineren eGFP-positiven Zellaggregaten umgeben. Diese Beobachtung wurde sowohl bei Kolonien gemacht, die aus CD150⁺-HPC (Abb.: 4.7 b), als auch bei denen, die aus CD150⁻-HS/PC entstanden (Abb.: 4.7 c). Als Kontrolle wurden unfraktionierte CD34⁺-HS/PC MOCK-exponiert. Bei den Kolonien des MOCK-Kontrolllexperiments wurden weder GFP-Signale detektiert, noch die Kolonien umgebende Zellaggregate beobachtet (Abb.:4.7 a). Diese Befunde legen den Schluss nahe, dass MV HS/PC zumindest *in vitro* durchaus auch CD150-unabhängig infizieren kann. Für gewöhnlich infiziert MV Zellen lytisch und verursacht in Zellkultur einen ausgeprägten zytopathischen Effekt der zum Zelltod führt. Dieser Effekt konnte bei humanen HS/PC nicht beobachtet werden. ED- und IC323-exponierte Zellen wurden 2 Tage nach Exposition mit 7AAD gefärbt und der prozentuale Anteil toter Zellen durchflusszytometrisch ermittelt.

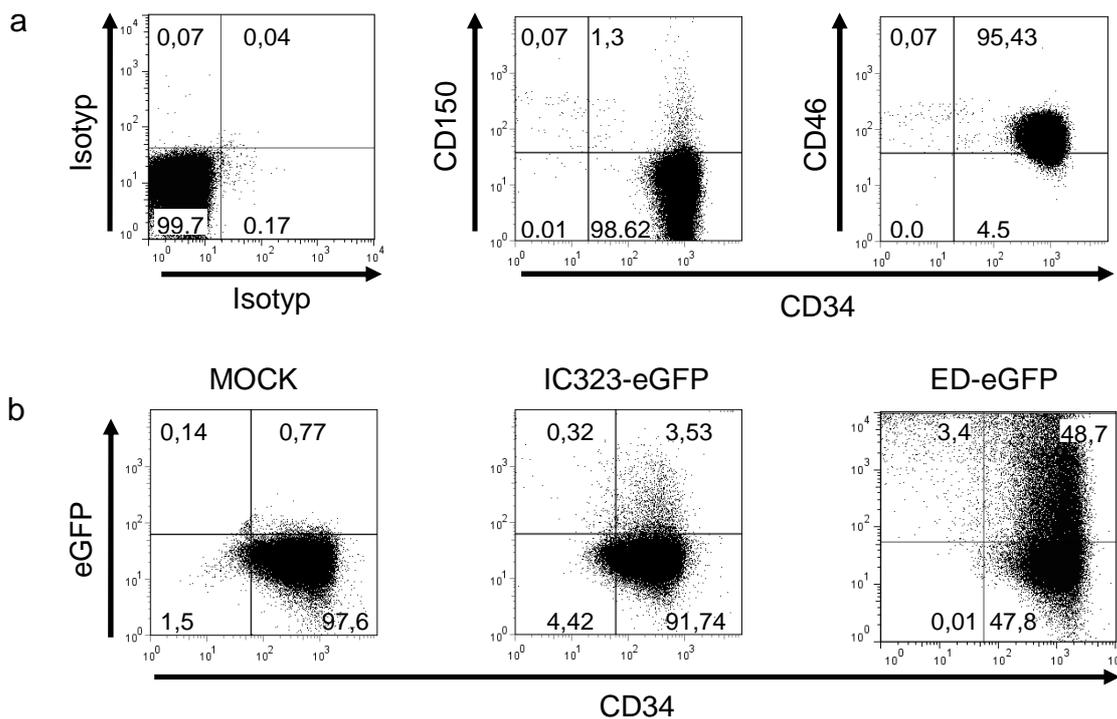


Abb. 4.6: Masernrezeptoren und Maserninfektion bei humanen HS/PC

a) Die Oberflächenexpression der beiden bekannten MV-Rezeptoren wurde bei HS/PC durchflusszytometrisch untersucht. Gezeigt wird je eine repräsentative Messung von 72 (CD150) (mittleres Bild) bzw. 9 (CD46) (rechtes Bild) Messungen mit dazugehöriger Isotypkontrolle (linkes Bild). b) HS/PC wurden mit dem wildtypischen Stamm IC323-eGFP (mittleres Bild) bzw. dem attenuierten Stamm ED-eGFP (rechtes Bild) mit einer M.O.I. von 5 infiziert. MOCK-exponierte HS/PC dienten als Negativkontrolle (linkes Bild). Nach 48h wurde die Infektionsrate anhand der eGFP-Expression durchflusszytometrisch ermittelt. Gezeigt wird je eines von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Dieser unterschied sich nicht signifikant vom prozentualen Anteil toter Zellen im Kontrollversuch mit MOCK- exponierten HS/PC (Abb.: 4.8 a). Weiterhin wurde untersucht ob sich 6 Tage nach einer Exposition mit dem Wildtypstamm WTF ein Einfluss auf die Viabilität ermitteln lässt. Auch nach 6 Tagen lässt sich kein höherer Anteil toter Zellen messen als im Versuch mit MOCK-exponierten Zellen (Abb.: 4.8 b). MV beeinträchtigt seine Zielzellen nicht nur im Falle einer Infektion. Für einige Effekte auf Zellen genügt allein schon der Kontakt seiner Glykoproteine mit zellulären Oberflächenmolekülen. T-Zellen, die normalerweise nach einer Antigenpräsentation durch DC stark proliferieren, sind in ihrer Proliferation inhibiert wenn sie zuvor mit UV-inaktiviertem MV inkubiert wurden. Da Ähnliches für die Expansion von HS/PC *in*

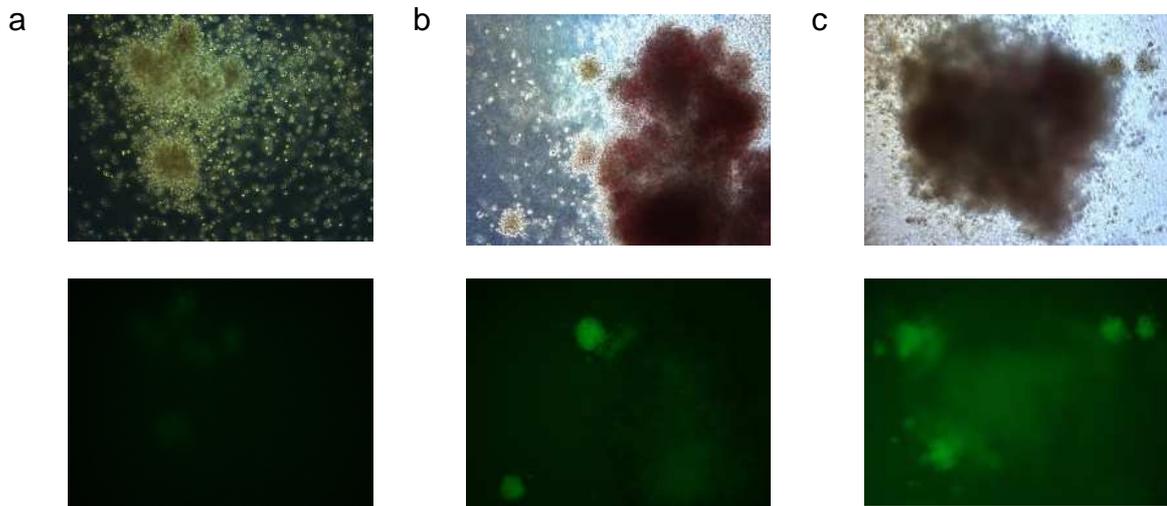


Abb. 4.7: CFA MV-exponierter CD150⁺- bzw. CD150⁻- HS/PC

HS/PC wurden durchflußytometrisch bezüglich ihrer CD150-Expression getrennt und entweder MOCK oder dem Wildtypstamm IC323-eGFP (M.O.I. 5) exponiert. Nach 1h Exposition wurde ungebundenes Virus durch Zentrifugieren und Resuspendieren in frischem Medium entfernt und die Zellen im CFA eingesetzt. Gezeigt werden entstandene Kolonien aus a) MOCK-exponierten HS/PC, b) IC323-eGFP-exponierten CD150⁺-HPC und c) IC323-eGFP-exponierten CD150⁻-HS/PC a-c) Repräsentative Bilder mindestens dreier unabhängiger Experimente

in vitro noch nicht untersucht wurde, wurden HS/PC CFSE markiert, für 1 h wild-typischem WTF exponiert und anschließend in BBMM kultiviert, das die Zytokine SCF (50 ng/ml), IL-3 (10 ng/ml), IL-6 (50 ng/ml), TPO (10 ng/ml) und flt3-Ligand (10 ng/ml) enthielt. Die Proliferationsrate wurde 2 bzw. 6 Tage nach Virusexposition durchflußytometrisch analysiert. Nach 2 Tagen, ein Zeitraum, indem man ca. einen Zellteilungszyklus erwarten kann, ist der Verlust an Fluoreszenzintensität, der sich dadurch ergibt, dass das CFSE während der Zellteilung auf die Tochterzellen aufgeteilt wird, bei MOCK- und virusexponierten HS/PC gleich stark (Abb.: 4.8 c linkes Bild). Daraus lässt sich ableiten, dass die Zellen in beiden Ansätzen eine gleiche Proliferationsrate haben. Auch 6 Tage nach Infektion ist kein Einfluss der MV-Exposition auf die Proliferation der HS/PC *in vitro* zu sehen (Abb.: 4.8 c rechtes Bild).

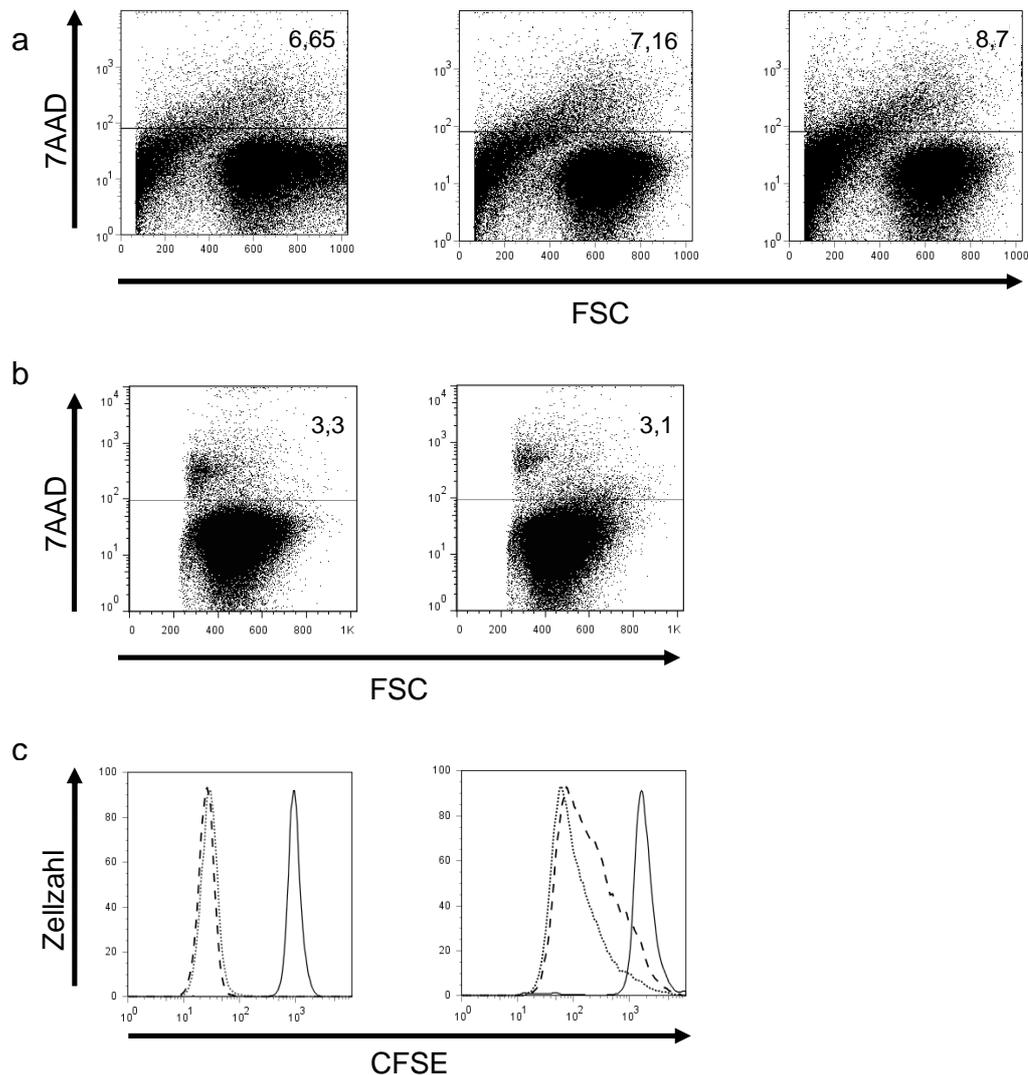


Abb. 4.8: Viabilität und Proliferation von HS/PC nach MV-Exposition

Die Viabilität und die Proliferation von HS/PC wurde nach einstündiger MV-Exposition und anschließender Kultivierung in BBMM +SCF/IL-3/IL-6/TPO/flt3L durchflusszytometrisch analysiert. a) HS/PC wurden MOCK- (links), IC323-eGFP- (M.O.I. 5, mittig) oder ED-eGFP- (M.O.I. 5, rechts) exponiert. 2 Tage nach Exposition wurden die Zellen mit 7AAD gefärbt und der Anteil toter Zellen ermittelt. b) HS/PC wurden MOCK- (links) bzw. WTF-exponiert (rechts) und nach 6 Tagen wurden die Zellen mit 7AAD gefärbt und der Anteil toter Zellen ermittelt. c) HS/PC wurden mit CFSE markiert und die Fluoreszenzintensität bei einem Teil der Zellen sofort gemessen. Die restlichen Zellen wurden anschließend MOCK- bzw. WTF-exponiert (M.O.I. 5). An Tag 2 (links) und 6 (rechts) nach Exposition wurde erneut die Fluoreszenzintensität der Zellen gemessen und im Vergleich zur Tag 0-Messung dargestellt. Tag 0 = durchgezogene Linie, MOCK = gestrichelte Linie, WTF = gepunktete Linie a+b) Repräsentative Messungen je dreier unabhängiger Experimenten

4.1 Interaktion der Stammzellnische mit MV

Nachdem die Infizierbarkeit der HS/PC mit MV nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage nach einer möglichen Interaktion des Virus mit der HS/PC-Nische. Stromazellen im Knochenmark bilden die Nische der HS/PC und sorgen unter anderem durch die Sekretion von Zytokinen für eine Umgebung, in der HSC einerseits ihr undifferenziertes Stadium erhalten können, aus der sie andererseits aber auch Hämatopoese initiieren (Greenberger, 1991). Eine Voraussetzung für die Infektion von HS/PC *in vivo* wäre, dass das Virus Zugang zu dieser Nische hat und hier auch auf Zielzellen trifft, in denen es replizieren kann. *In vitro* sollte deshalb die Infizierbarkeit von Knochenmarksstromazellen und die Transmission von MV zwischen Knochenmarksstromazellen und HS/PC untersucht werden. Darüber hinaus sollte auch die Transmission von MV von infizierten Lymphozyten zu HS/PC bzw. Knochenmarksstromazellen analysiert werden, was für das MV eine mögliche Route zur HS/PC-Nische *in vivo* darstellen könnte.

4.1.1 MV infiziert Knochenmarksstromazellen

Knochenmarksstromazellen wurden zunächst in 6-Lochplatten bis zur 70-100 % Konfluenz kultiviert und anschließend mit IC323-eGFP oder ED-eGFP mit einer MOI von 2 für 1 h infiziert. Der attenuierte Stamm ED-eGFP infizierte die Stromazellen sehr effizient. Die Infektion breitete sich innerhalb von drei Tagen über die gesamte Stromazellkultur aus und führte im weiteren Verlauf zur lytischen Zerstörung der Zellen (Abb.: 4.9 a). Im Gegensatz dazu war die Infektion mit dem wildtypischen Stamm IC323-eGFP weniger effizient. Die Ausbreitung der Infektion schritt kaum bzw. nur sehr langsam voran. Selbst nach 20 Tagen war ein Großteil der Zellen uninfiziert geblieben (Abb.: 4.9 b). Ein lytischer Verlauf der Infektion war nicht zu beobachten. Im Gegenteil, die infizierten Zellen lebten auch noch nach 20 Tagen, so dass man von einer persistenten Infektion der Stromazellen sprechen kann. Der fehlende zytopathische Effekt nach IC323-Infektion warf die Frage nach der Rolle der MV-Rezeptoren auf. Es ist bekannt, dass MV Zellen *in vitro* und *in vivo* auch CD150- und CD46-unabhängig infizieren kann, und dass in diesem Fall *in vitro* die Synzytienbildung ausbleibt. Deshalb wurde die Expression der beiden Rezeptoren sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene untersucht. Für die Analyse der

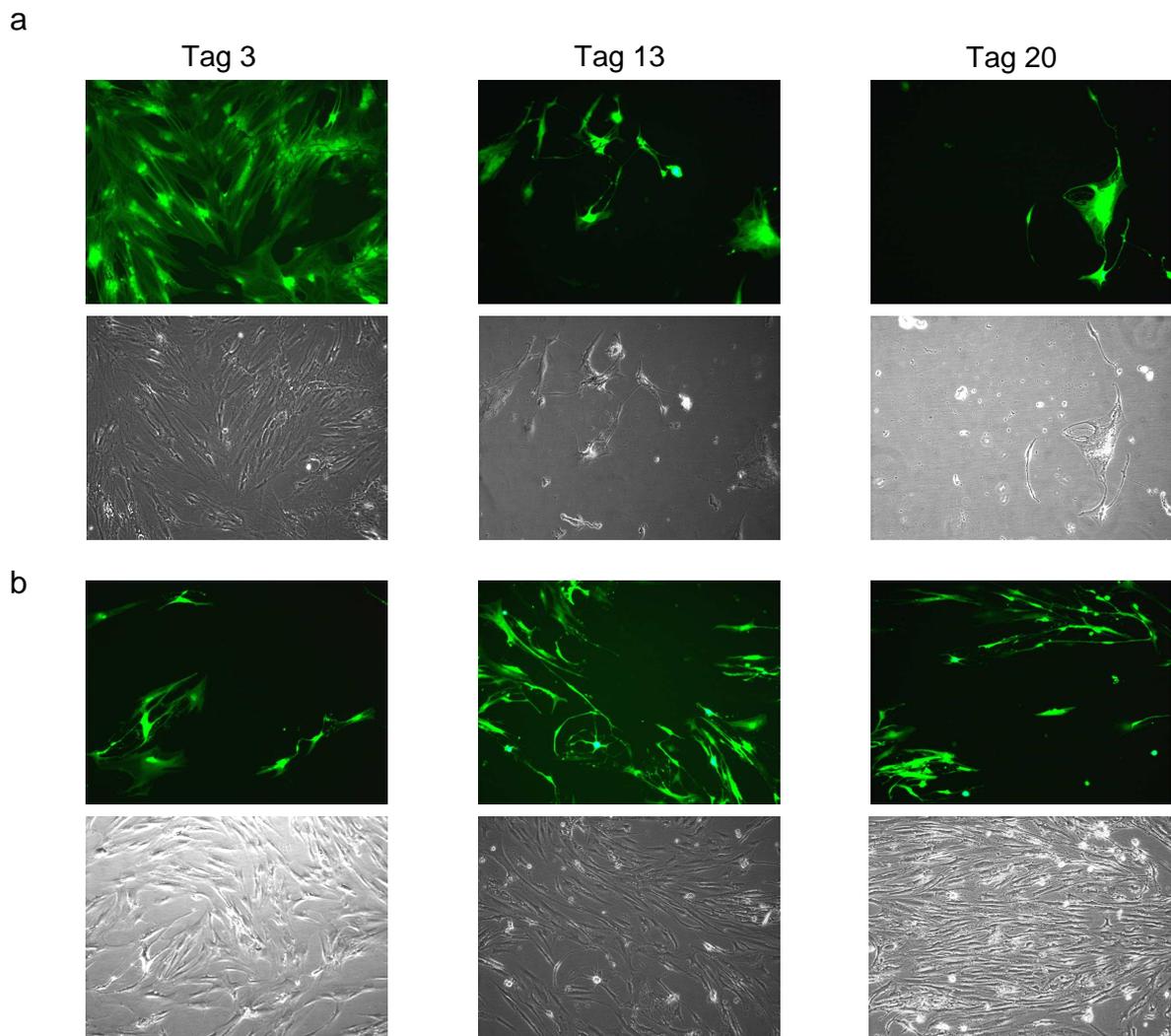


Abb. 4.9: MV-Infektion von Knochenmarksstromazellen

Knochenmarksstromazellen wurden in 6-Lochplatten kultiviert. Nachdem der Zellrasen konfluent war, wurden die Zellen für 1h in serumfreiem Medium mit MV (M.O.I. 2) infiziert. Anschließend wurde das Fortschreiten der Infektion zu den angegebenen Zeitpunkten mikroskopisch analysiert. a) Infektion mit dem attenuierten Stamm ED-eGFP. b) Infektion mit dem wildtypischem Stamm IC323-eGFP a+b) Repräsentative Abbildungen 13 unabhängiger Experimente.

mRNA wurde aus Stromazellen isolierte RNA mit Hilfe von oligo-dT-Primern in cDNA revers transkribiert. Diese cDNA wurde anschließend benutzt, um mittels PCR zu untersuchen, ob sich ursprünglich CD150- bzw. CD46-mRNA in den Zellen befand. So konnte der Nachweis erbracht werden, dass Knochenmarksstromazellen zwar wie

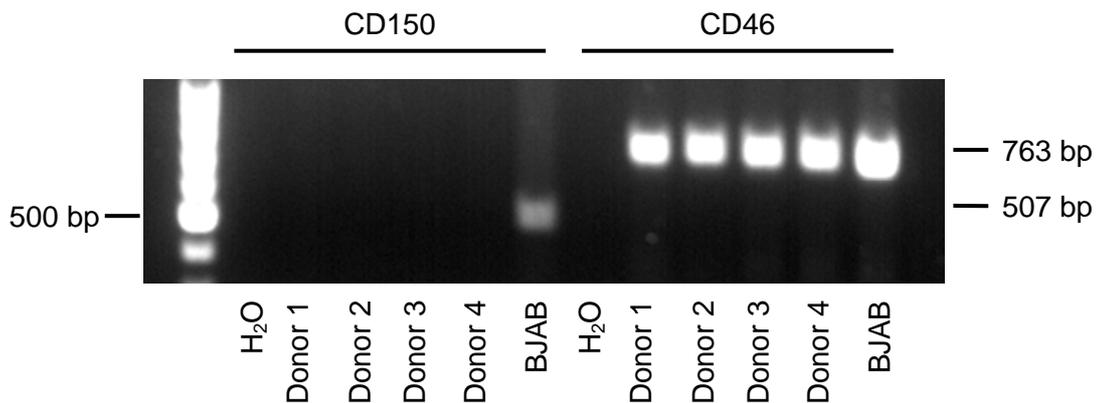


Abb. 4.10: mRNA-Nachweis von CD150 und CD46 in Knochenmarksstromazellen

Durch RT-PCR wurde untersucht, ob sich in den RNA-Präparationen von verschiedenen Knochenmarksstromazellenproben mRNA von CD150 bzw. CD46 nachweisen ließ. RNA aus BJAB-Zellen wurden als Positivkontrolle für beide Nachweise benutzt. Gezeigt wird die elektrophoretische Analyse von PCR-Produkten im 1 % Agarosegel.

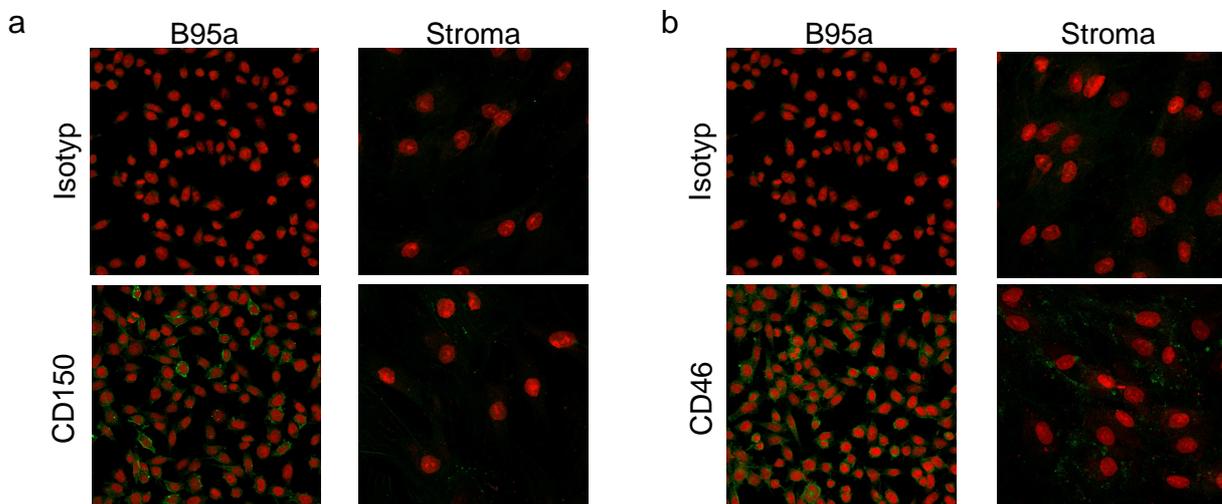


Abb. 4.11: Nachweis von CD150 und CD46 in Knochenmarksstromazellen

Knochenmarksstromazellen wurden mit Paraformaldehyd fixiert und mit Triton X permeabilisiert, bevor sie für Immunfluoreszenzaufnahmen mit Antikörpern inkubiert wurden. B95a-Zellen dienen als Positivkontrolle in beiden Experimenten. a) Nachweis von CD150 bei Knochenmarksstromazellen mit dem Antikörper IPO3 b) Nachweis von CD46 bei Knochenmarksstromazellen mit dem Antikörper 10/88 a+b) Je eine repräsentative Aufnahme dreier unabhängiger Experimente

alle kernhaltigen Zellen CD46, nicht jedoch CD150 exprimieren, dessen Expression bisher auch nur für hämatopoetische Zellen beschrieben wurde (Abb.: 4.10). Das Vorhandensein bzw. Fehlen von mRNA ist zwar bereits ein Nachweis bezüglich der Präsenz des jeweiligen Proteins, trotzdem wurde auch ein direkter Nachweis durch Immunofluoreszenzfärbung durchgeführt. Hierzu wurden Knochenmarksstromazellen mit den Antikörpern IPO3 (Maus anti-hCD150), 10/88 (Maus anti-hCD46) oder I14 (Maus IgG₁ als Isotypkontrolle) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach anschließendem dreimaligem Waschen wurden die Proben mit dem sekundären Antikörper anti-Maus IgG₁, an den der Farbstoff Alexa-488 konjugiert war, für 1 h bei 4°C inkubiert, um gebundenen Primärantikörper zu detektieren. Die RT-PCR-Ergebnisse bestätigend, konnte CD46 (Abb.: 4.11 b) aber nicht CD150 (Abb.: 4.11 a) fluoreszenzmikroskopisch bei Knochenmarksstromazellen nachgewiesen werden. Durch Rezeptorblockierung wurde nun untersucht, ob die Infektion der Knochenmarksstromazellen durch die beiden MV-Stämme rezeptorabhängig war. Die Knochenmarksstromazellen wurden für 1 h mit IPO3, B97 (anti-CD46) oder I14 (IgG₁-Isotypkontrolle) in einer Konzentration von 20 ng/ml bei 37°C präinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer M.O.I. von 2 infiziert. Mit IPO3 präinkubierte Zellen wurden mit dem Wildtypstamm IC323-eGFP, mit B97 präinkubierte Zellen mit dem attenuierten Stamm ED-eGFP infiziert. In beiden Fällen dienten Zellen, die mit dem Isotyp inkubiert wurden als Negativkontrolle und die Zelllinie VerohSLAM bzw. Vero als Positivkontrolle für das Experiment. Die beiden Zelllinien wurden aufgrund ihrer guten Infizierbarkeit und des schnellen lytischen Verlaufs nur mit einer M.O.I. von 0,1 infiziert. Der jeweilige Antikörper war auch während der einstündigen Infektion und in den Tagen nach Infektion durchgehend im Medium vorhanden. Im Falle des ED-Stammes war die Infektion der Zellen in der Tat CD46-abhängig. Durch die Inkubation mit dem blockierenden anti-CD46-Antikörper vor, während und nach der Infektion wurde die Infektionsrate reduziert (Abb.: 4.12 a). Im Gegensatz dazu hatte eine Inkubation mit anti-CD150-Antikörpern keinen Einfluss auf die Infektionseffizienz und den Infektionsverlauf des wildtypischen IC323-eGFP (Abb.: 4.12 b). Der Infektionsverlauf des ED-eGFP veränderte sich in Anwesenheit des anti-CD46-Antikörpers jedoch im Vergleich zu der Infektion in antikörperfreiem bzw. isotyphaltigem Medium (Abb.: 4.9a und Abb.: 4.12c). Während ED-eGFP in Anwesenheit des Isotyps weiterhin in den ersten 2 Tagen das gesamte Stroma

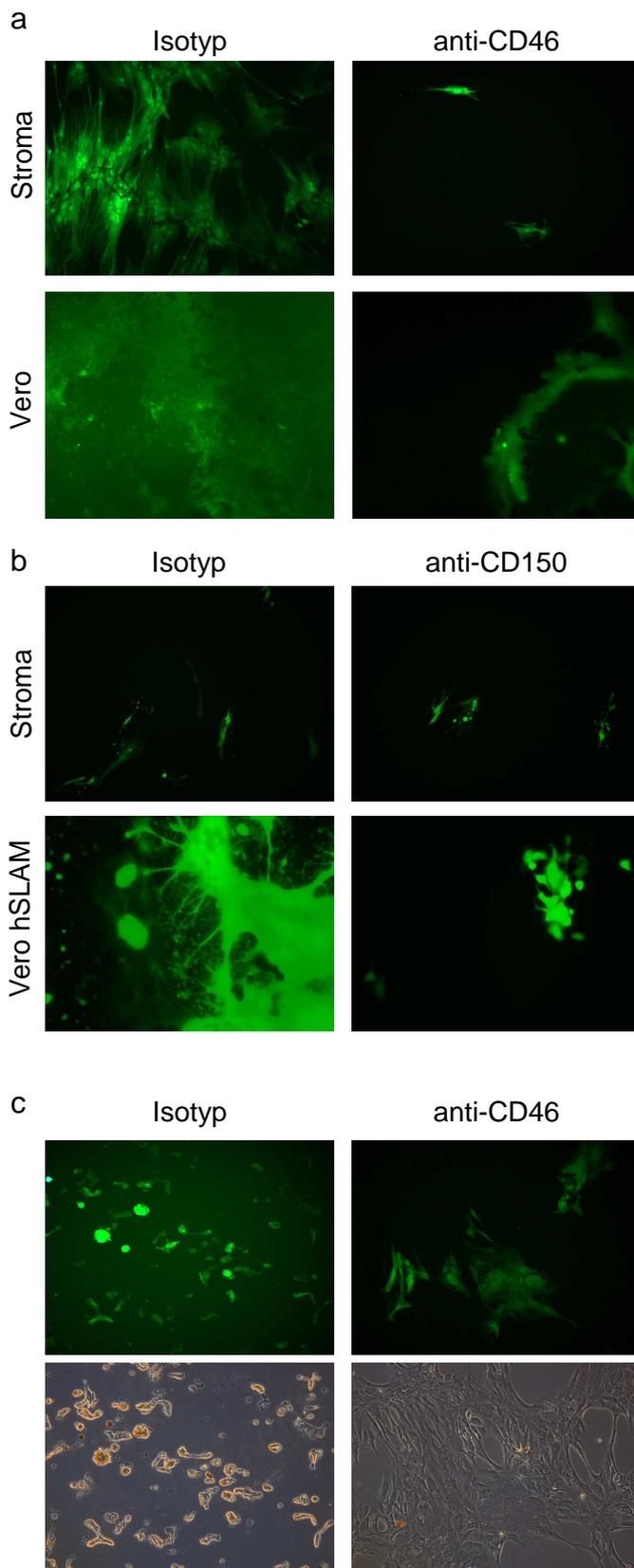


Abb. 4.12: Blockieren der Infektion

Durch den Einsatz der blockierenden Antikörper B97 (anti-CD46) und IPO3 (anti-CD150) wurde untersucht, ob die Infektion von Stromazellen mit ED-eGFP bzw. IC323-eGFP blockiert werden kann und somit CD46- bzw. CD150-abhängig ist.

a) Stromazellen (obere Reihe) und Vero-Zellen (untere Reihe) wurden vor, während und nach der Infektion mit ED-eGFP (M.O.I. 2) mit B97 bzw. einer Isotypkontrolle (beide 20ng/ml) inkubiert. Gezeigt werden beispielhaft Bilder 3 Tage nach Infektion von einem von 3 unabhängigen Experimenten.

b) Stromazellen (obere Reihe) und Vero-hSLAM-Zellen (untere Reihe) wurden vor, während und nach der Infektion mit IC323-eGFP (M.O.I. 2) mit IPO3 bzw. einer Isotypkontrolle (beide 20ng/ml) inkubiert. Gezeigt werden beispielhaft Bilder 3 Tage nach Infektion von einem von 2 unabhängigen Experimenten.

c) Gezeigt werden Stromazellen von Experiment a am Tag 13 nach Infektion.

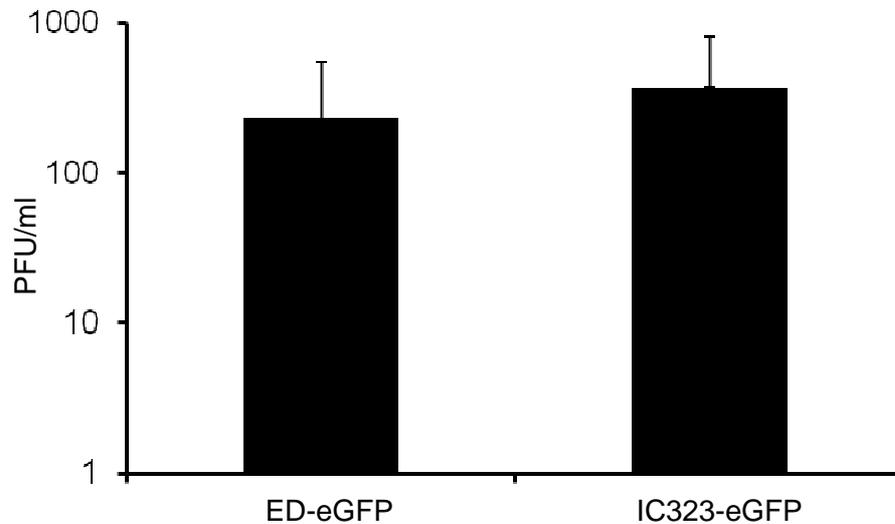


Abb. 4.13: Virustiter von Stromazellkulturüberständen

Knochenmarksstromazellen wurden in 6-Lochplatten kultiviert und bei Erreichen der Konfluenz wurde je ein Napf für 1 h mit ED-eGFP oder IC323-eGFP infiziert. Anschließend wurde das Inokulum durch 2 ml frisches Medium je Napf ersetzt. Nach drei Tagen wurde der Zellkulturüberstand titriert. Gezeigt werden Mittelwerte mit Standardabweichung von je 4 unabhängigen Experimenten.

infizierte und die Zellen bereits nach 7 Tagen weitestgehend lytisch zerstörte, konnte in Anwesenheit von B97 eine verlangsamte und lokale Ausbreitung der Infektion beobachtet werden. Desweiteren blieb auch in den folgenden 13 Tagen eine Lyse infizierter Zellen aus (Abb.: 4.12c). Trotz des offensichtlich unterschiedlichen Infektionsverlaufs zwischen wildtypisch und attenuiert infizierten Knochenmarksstromazellen sezernierten unter normalen Bedingungen Knochenmarksstromazellen infektiöse Partikel beider MV-Stämmen ins Medium. Der Überstand der infizierten Stromazellen, die zum Zeitpunkt der Infektion konfluent in dem Napf einer 6-Lochplatte angewachsen waren und anschließend in 2 ml Medium kultiviert wurden, enthielt im Schnitt $2,32 \times 10^2$ PFU/ml ED-eGFP bzw. $3,74 \times 10^2$ PFU/ml IC323-eGFP, was sich statistisch nicht signifikant voneinander unterscheidet (Abb.: 4.13).

4.1.2 Knochenmarksstromazellen und HS/PC übertragen beide MV

Nachdem gezeigt wurde, dass MV prinzipiell im Knochenmark auf Zielzellen treffen kann, die anschließend infiziert werden können, wurde im Folgenden untersucht, ob die Transmission von MV zwischen Stromazellen und HS/PC ebenfalls möglich ist. Dazu wurden zum einen HS/PC entweder mit ED-eGFP bzw. IC323-eGFP, jeweils mit M.O.I. 5, infiziert und mit uninfizierten Knochenmarksstromazellen kokultiviert oder aber uninfizierte HS/PC mit Knochenmarksstromazellen kokultiviert, die ihrerseits jeweils mit einem der beiden Stämme mit einer MOI von 2 infiziert wurden. In beiden Fällen und für beide MV-Stämme wurde 5 Tage nach Beginn der Kokultivierung Virustransmission nachgewiesen (Abb.: 4.14). Wie auch in den Einzelexperimenten zeigte sich erneut, dass die Infektion mit dem attenuierten ED-Stamm bei beiden Zelltypen effizienter war als mit dem wildtypischen IC323-Stamm, aber auch die Transmission zum jeweils anderen Zelltyp verlief effizienter mit ED-eGFP. Darüber hinaus kam es im Fall der ED-eGFP-infizierten Kokulturen zur Lyse der Zellen, so dass nach 12 Tagen im Gegensatz zur IC323-eGFP-infizierten Kokulturen kaum noch ein Stroma vorhanden und die Zahl der HS/PC stark reduziert war (Abb.: 4.15). In den IC323-eGFP-infizierten Kokulturen waren auch noch nach 12 Tagen der Großteil der HS/PC und der Stromazellen nicht infiziert und die infizierten Zellen waren immer noch vital. Erneut etablierte sich *in vitro* eine persistente Infektion.

4.1.1 Infizierte Lymphozyten können MV auf Stromazellen übertragen

Da Stromazellen und HS/PC offensichtlich empfänglich für eine MV-Infektion sind, galt es die Frage zu klären, wie das Virus ins Knochenmark und so zu den Stromazellen bzw. HS/PC gelangen könnte. Es ist aus Versuchen mit Makaken (*Macaca fascicularis*) bekannt, dass sowohl infizierte B- als auch T-Zellen im Knochenmark vorgefunden werden können (de Swart et al, 2007). In einer weiteren Studie konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass sich nur wildtypisches MV erfolgreich in den Tieren ausbreitet und Lymphozyten infiziert, die dann in lymphatische Gewebe migrieren (de Vries et al, 2010). Dieser Befund gibt einen Hinweis darauf, wie MV *in vivo* in die Nische gelangen könnte und dort HS/PC infizieren könnte. Diese Hypothese sollte untersucht werden, indem die Transmission

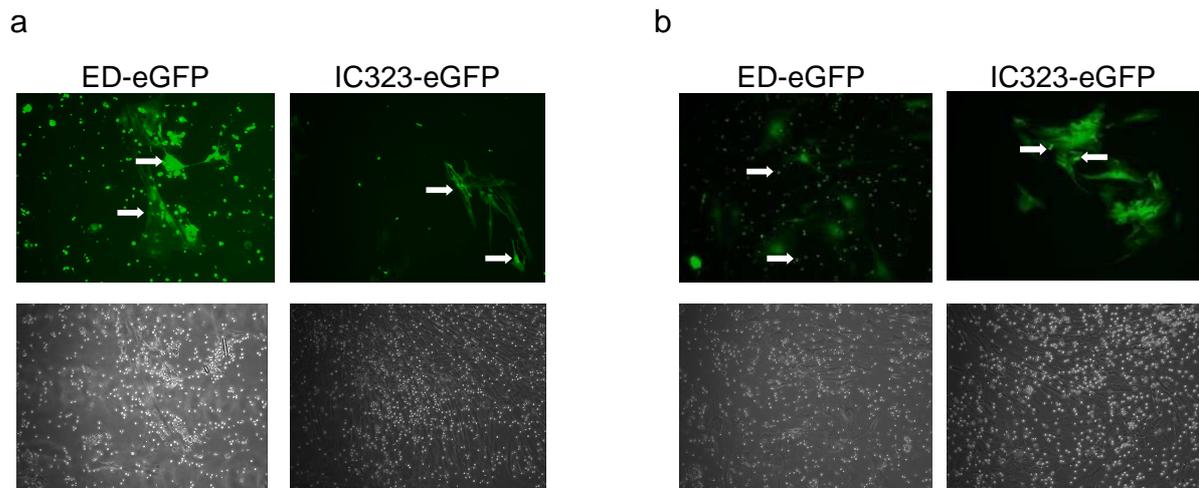


Abb. 4.14: Virustransmission zwischen HS/PC und Knochenmarksstromazellen

Knochenmarksstromazellen und HS/PC wurden nach Infektion eines der beiden Zelltypen kokultiviert und die Transmission von MV zum jeweils anderen Zelltypen fluoreszenzmikroskopisch bestätigt (siehe Pfeile). a) HS/PC wurden mit ED- bzw. IC323-eGFP (M.O.I. 5) infiziert und mit uninfizierten Knochenmarksstromazellen kokultiviert. b) Kokulturen in denen Knochenmarksstromazellen infiziert (M.O.I. 2) wurden. a+b) Je eine repräsentative Aufnahme von Tag 5 der jeweiligen Kokultur. Je ein Beispiel je dreier unabhängiger Experimente.

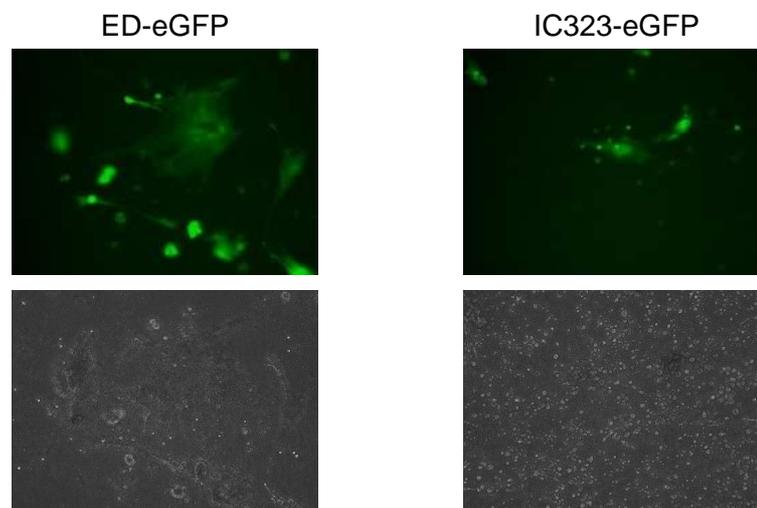


Abb. 4.15: Zerstörung des Stromas nach ED-eGFP-Transmission in Kokultur

Mit fortschreitender Dauer der Kokultivierung waren bei den mit ED-eGFP infizierten Kokulturen Zerstörungen des Stromas zu beobachten, mit denen ein Verlust an HS/PC einherging. Beispielaufnahmen von Kokulturen an Tag 12. HS/PC wurden mit IC323-eGFP bzw. ED-eGFP mit M.O.I. 5 infiziert und mit uninfizierten Knochenmarksstromazellen kokultiviert.

von wildtypischem IC323-eGFP von infizierten Lymphozyten *in vitro* gezeigt wird. In Kokultivierungsexperimenten wurde zunächst die MV-Transmission von PMA/Iono präaktivierten und infizierten primären T-Zellen bzw. infizierten BJAB-Zellen auf Stromazellen analysiert. Die Lymphozyten wurden für eine Stunde mit einer MOI von 0,5 infiziert. Anschließend wurde ungebundenes Virus durch Waschen mit PBS entfernt und die Lymphozyten zu den Knochenmarksstromazellen gegeben. Bei Kokulturen mit direktem Kontakt zwischen den zwei Zelltypen konnten infizierte Stromazellen bereits 24 h nach Beginn der Kokultivierung detektiert werden und die Infektion breitete sich in den darauf folgenden 7 Tagen in der Stromazellkultur aus (Abb.: 4.16 a + b jeweils linke Spalte). Die Transmission des Virus von T-Zellen zu den Stromazellen war dabei effektiver als bei BJAB-Zellen. Es wurden in derselben Zeit mehr Stromazellen durch infizierte T-Zellen infiziert als durch BJAB-Zellen. Weiterhin wurde untersucht, ob es *in vitro* eines direkten Zell-Zell-Kontakts bedarf um die CD150⁻-Zellen zu infizieren. Um zu klären, ob ein direkter Kontakt zwischen den infizierten Lymphozyten und den Stromazellen für die Virustransmission notwendig ist, wurden mit wildtypischem MV infizierte T-Zellen durch einen Filter mit 4 µm Porengröße getrennt von den Knochenmarksstromazellen im selben Napf kultiviert, sodass nur freie Viruspartikel zu den Stromazellen diffundieren konnten. Bei diesem Versuchsaufbau konnten zwar ebenfalls infizierte Stromazellen detektiert werden, allerdings erst zwischen Tag 4 und 9 nach Beginn der Kokultivierung (Abb.: 4.16 a rechte Spalte). Im weiteren Verlauf breitet sich die Infektion langsam unter den Stromazellen aus. Da Stromazellen das Zytokin SDF-1 sekretieren können, das Lymphozyten chemotaktisch anzieht, wurden alle Näpfe dahingehend untersucht, ob infizierte T-Zellen durch den Filter migriert sind. In keinem der drei unabhängigen Experimente wurden jedoch infizierte T-Zellen in direktem Kontakt zu den Knochenmarksstromazellen entdeckt. Dies zeigt deutlich, dass von T-Zellen freigesetztes MV ausreicht, um Knochenmarksstromazellen zu infizieren. In einem einmalig durchgeführten Experiment, konnte die Virustransmission ohne direkten Zell-Zellkontakt auch für infizierte BJAB-Zellen bestätigt werden (Abb.: 4.16 b rechte Spalte).

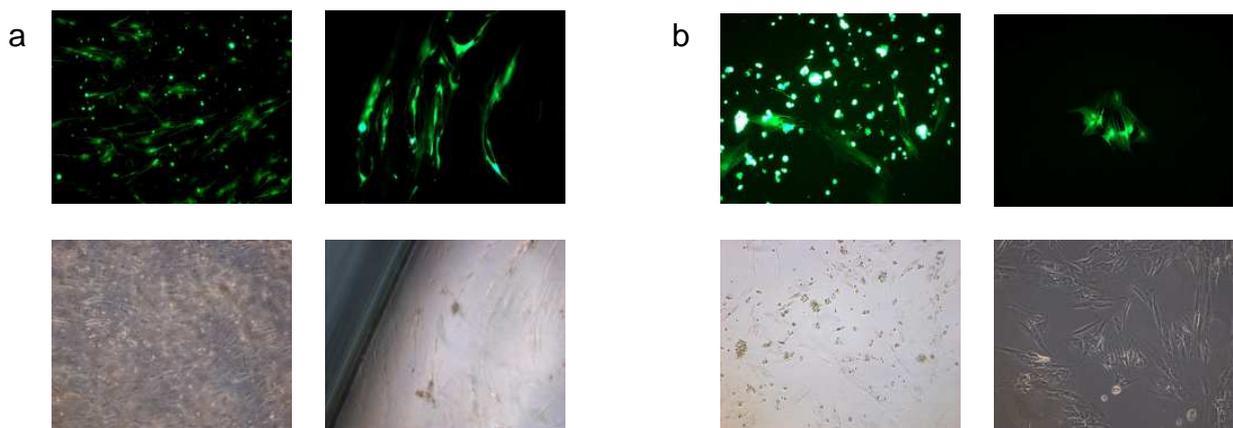


Abb. 4.16: MV-Transmission von infizierten Lymphozyten zu Knochenmarksstromazellen

Lymphozyten wurden mit IC323-eGFP mit einer M.O.I. von 0,5 infiziert und anschließend mit Knochenmarksstromazellen im Napf einer 6-Lochplatte kokultiviert. Nach erfolgter MV-Transmission produzierten Knochenmarksstromazellen eGFP. a) Infizierte, präaktivierte T-Zellen wurden mit direktem Kontakt (linke Spalte) oder durch einen Filter getrennt (rechte Spalte) in einem Napf mit Knochenmarksstromazellen kokultiviert. b) Gleiches Experiment wie a jedoch mit infizierten BJAB anstatt T-Zellen. a + b) Je eine repräsentative Aufnahme von 5 (direkter Kontakt) bzw. 3 (T-Zellen, Filter) unabhängigen Experimenten. Gezeigt werden Aufnahmen von Tag 7 (direkter Kontakt) und Tag 20 (Filter) nach Beginn der Kokultur.

4.1.2 HS/PC werden effizienter durch den Kontakt mit infizierten Lymphozyten infiziert als durch freies Virus

Interessanter als die Frage, ob sich die MV-Infektion durch infizierten Lymphozyten auf die Zellen der HS/PC-Nische MV überträgt, ist die Frage, ob das Gleiche auch direkt für HS/PC gezeigt werden kann. Dazu wurden erneut präaktivierte, primäre T Zellen bzw. BJAB-Zellen mit IC323-eGFP für eine Stunde und mit einer M.O.I. von 0,1 infiziert und anschließend ungebundene Viruspartikel durch Waschen entfernt. So behandelte Lymphozyten wurden dann im Verhältnis 1:1 mit HS/PC in Suspension im Napf einer 96-Lochplatte kokultiviert. 48 h nach Beginn der Kokultivierung wurden die Zellen durchflußzytometrisch analysiert. Es konnten nicht nur infizierte HS/PC detektiert werden, sondern auch eine viel höhere Infektionsrate, als sie mit freiem Virus und M.O.I. 5 erreicht wurde (Beispiel Abb.: 4.6 b). Im Durchschnitt waren nach 48 h Kokultur mit T-Zellen 19.39 % der HS/PC infiziert und

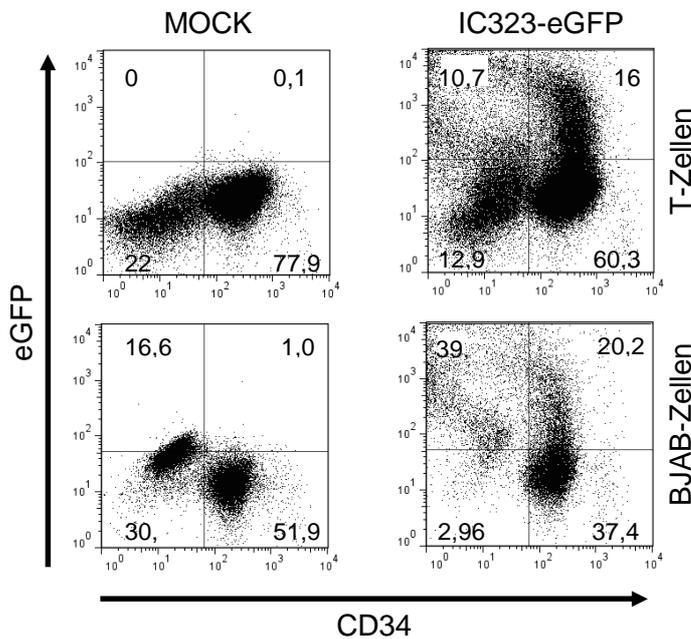


Abb. 4.17: MV-Transmission von infizierten Lymphozyten zu HS/PC

Präaktivierte T-Zellen (obere Bildreihe) bzw. BJAB-Zellen (untere Bildreihe) wurden mit IC323-eGFP mit einer M.O.I. von 0,1 infiziert und anschließend 48 h mit HS/PC kokultiviert. Nach der Kokultivierung wurde die Infektionsrate bei HS/PC bestimmt, indem der Anteil an GFP-positiven HS/PC durchflusszytometrisch bestimmt wurde. Je ein repräsentatives Bsp. von 5 (BJAB-Zellen) bzw. 4 (T-Zellen) unabhängigen Experimenten.

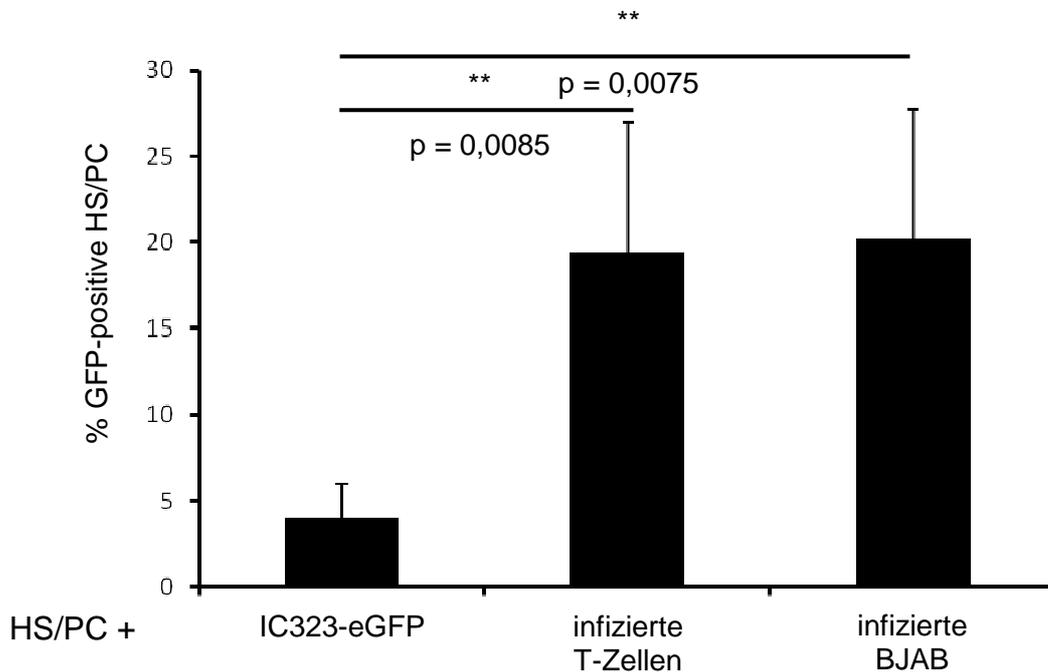


Abb. 4.18: Infektionsraten bei HS/PC nach Virustransmission durch Lymphozyten

HS/PC wurden entweder mit freiem Virus mit einer M.O.I. von 5 infiziert oder mit infizierten, präaktivierte T-Zellen bzw. BJAB kokultiviert. 48 h nach Infektion bzw. nach Ansetzen der Kokultur wurde die Infektionsrate durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen (Fehlerbalken) von jeweils mindestens 4 unabhängigen Experimente.

nach Kokultur mit BJAB 20.23 % (Bsp. s. Abb.: 4.17). Im Vergleich zu den mit freiem Virus durchschnittlich 4,02 % infizierten HS/PC ist dies eine statistisch hoch signifikante Steigerung der Infektionsrate (Abb.: 4.18). Die Berechnung der Signifikanz mit dem *student's t*-Test ergab für beide Transmissionspfade einen p-Wert von unter 0,01. Eine Infektion sowohl der HS/PC als auch der Stromazellen mit MV, das über infizierte Lymphozyten zu diesen gelangt, ist demzufolge nicht nur möglich, sondern *in vitro* auch viel effizienter.

4.2 Effekt von MV-Exposition auf die Kolonienbildung

4.2.1 MV-Exposition wirkt sich nicht auf die Kolonienzahl im CFA aus

Wie bereits beschrieben kann der Kontakt zu viralen Glykoproteinen die Proliferation von Zellen einschränken. Dafür ist es nicht notwendig, dass die Zellen CD150 exprimieren. Ebenso wie primäre T-Zellen kann man auch bei der CD150⁻-Zelllinie Jurkat einen durch MV-Kontakt induzierten Proliferationsarrest nach Stimulation beobachten (Avota et al, 2001). Da also weder eine Infektion noch die Oberflächenexpression von CD150 zwingend notwendig ist, um den normalen Zellzyklus zu stören, wurde untersucht, ob HS/PC durch die Exposition zu wildtypischem MV *in vitro* in ihrem Differenzierungspotential beeinträchtigt werden, auch wenn die Infektionsrate bei HS/PC mit 4,02 % sehr gering war. Wie in 1.2 beschrieben reifen HPC im CFA zu Kolonien aus myeloiden und erythroiden Vorläuferzellen aus. HS/PC wurden vor dem Aussäen in methylzellulosehaltigem Medium 1 h Mock bzw. wildtypischem MV ausgesetzt. Da in den folgenden Experimenten die Infektion selbst nicht visualisiert werden sollte, wurde der nicht rekombinante Wildtypstamm WTF eingesetzt. Zunächst wurden CFA mit der gesamten CD34⁺-Population durchgeführt. HS/PC wurden nach der immunomagnetischen Isolierung für 1 h MOCK- bzw. WTF-exponiert. Anschließend wurde ungebundenes Virus durch Waschen mit PBS entfernt. Nach der MV-Exposition wurden 400 Zellen/ml wie in 4.2 beschrieben ausgesät. Alle Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Da die Anzahl an Kolonien, die sich aus den 400 ausgesäten HS/PC entwickeln, stark donorabhängig schwankt, wurden die Ergebnisse erneut normalisiert, indem die jeweilige MOCK-Kontrolle als 100 % gesetzt wurde. So normalisiert und zusammengefasst war in den 12 durchgeführten

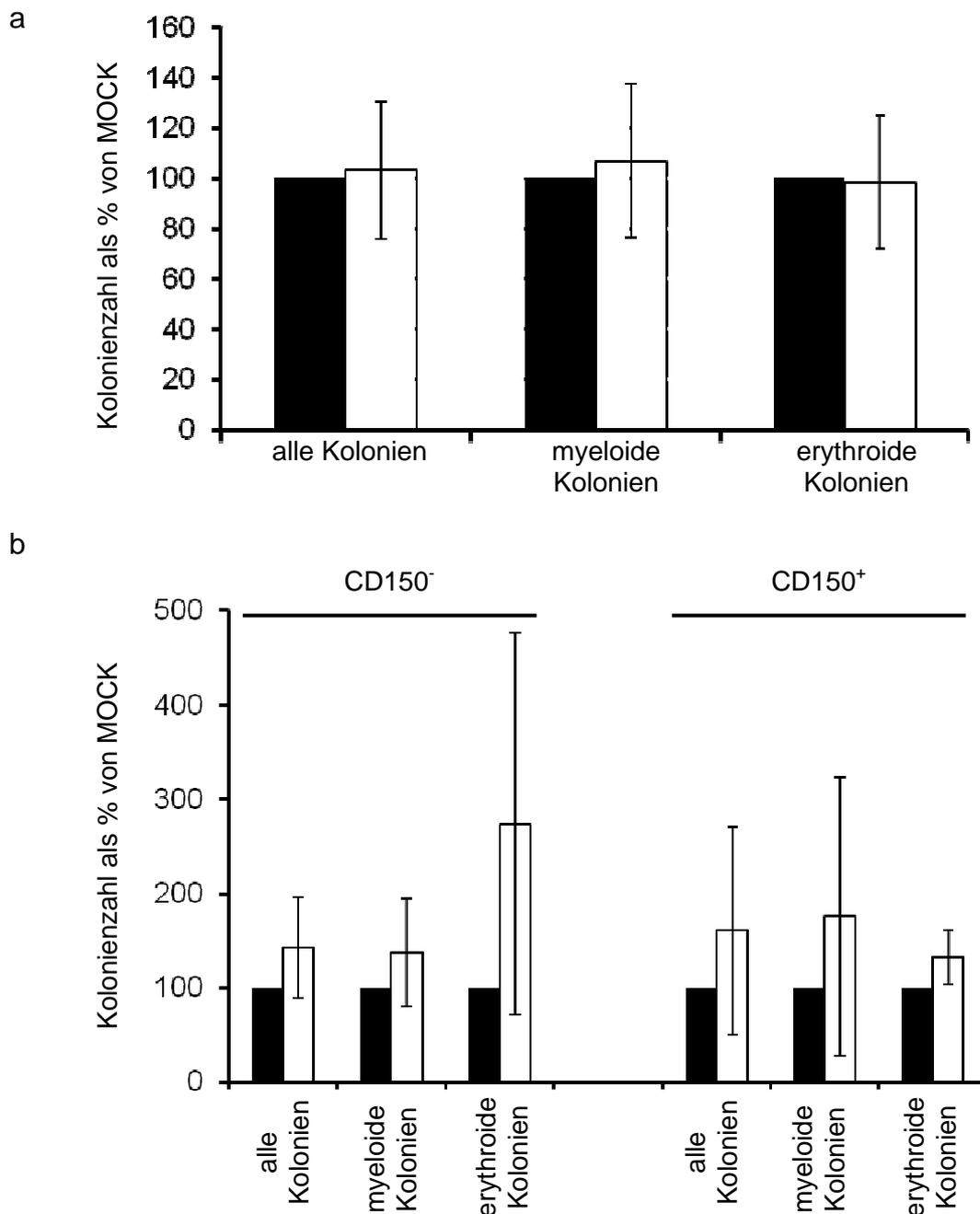


Abb. 4.19: Kolonienbildung nach MV-Exposition

HS/PC wurden für 1 h entweder MOCK (schwarze Balken) oder WTF (weiße Balken) exponiert (M.O.I. 5) bevor je 400 Zellen dann im CFA eingesetzt wurden. Die Anzahl der Kolonien in den MOCK-Experimenten wurde jeweils als 100 % gesetzt. a) Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen von 12 CFA mit CD34⁺-HS/PC aus 8 Nabelschnurblutproben und 4 Proben von Leukämiepatienten. b) HS/PC aus Nabelschnurblutproben wurden durchflusszytometrisch in CD150⁻-HS/PC und CD150⁺-HPC getrennt und nach 1 h MOCK- bzw. WTF-Exposition im CFA eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen dreier unabhängiger Experimente.

Experimenten kein Unterschied in der durchschnittlichen Kolonienanzahl zwischen CFA mit WTF- und MOCK-exponierten Zellen zu erkennen (Abb.: 4.19 a). Die statistische Auswertung ergab keine Signifikanz für beobachtete Unterschiede, weder bei der Gesamtanzahl an Kolonien, noch bei der getrennten Betrachtung von myeloiden und erythroiden Kolonien. Von den 12 CFA wurden 8 mit HS/PC aus Nabelschnurblut und 4 mit HS/PC aus peripherem Blut mobilisierter Leukämiepatienten durchgeführt. Da es bei der Kolonienbildung keinen Unterschied bezüglich der Herkunft der HS/PC gab, wurden die Ergebnisse wie schon bei der Phänotypisierung in 4.1 zusammengefasst.

4.2.2 MV-Exposition vermindert die Kolonienzahl CD150⁺-HPC nicht

Es konnte zwar keine Auswirkung der MV-Exposition auf die Kolonienbildung von HS/PC gezeigt werden, jedoch schließen die Experimente in 4.5.1 einen Effekt des MV auf die Kolonienbildung durch die CD150⁺-Subpopulation der HS/PC noch nicht aus. Deren Anteil an der Gesamtpopulation ist mit durchschnittlich 5,53 % so gering, dass eine verminderte Kolonienbildung durch diese Zellen möglicherweise nicht detektierbar wäre, zumal es selbst beim Dreifachansatz zwischen den drei Ansätzen einer Probe zu Schwankungen in der Kolonienzahl kommt, die größer als 5 % sein können. Um trotzdem einen Effekt auf die CD150⁺-HPC zu untersuchen, wurden CD34⁺-HS/PC aus Nabelschnurblut wie bereits beschrieben durchflusszytometrisch in CD150⁺-HPC und CD150⁻-HS/PC sortiert und beide Fraktionen getrennt voneinander untersucht. Wie bereits in 4.2.1 beobachtet, bildeten die 400 ausgesäten Zellen der CD34⁺/CD150⁻-Fraktion mehr Kolonien als die der CD34⁺/CD150⁺-Fraktion. Jedoch bilden beide Zellfraktionen sowohl myeloide als auch erythroide Kolonien aus, egal ob sie vorher MOCK- oder MV-exponiert wurden. Innerhalb einer Fraktion gab es keinen signifikanten Unterschied in der Kolonienanzahl zwischen den MOCK- und den MV-exponierten Zellen (Abb.: 4.19 b). Die MV-Exposition hat demzufolge *in vitro* weder einen Effekt auf die Fähigkeit von CD150⁻-HS/PC noch auf die Fähigkeit von CD150⁺-HPC Kolonien zu bilden.

4.3 Rekonstitution von NOD/SCID-IL2R γ ^{-/-}-Mäusen nach MV-Exposition

4.3.1 MV hat keine Auswirkung auf die Langzeitrekonstitution *in vivo*

Da im *in vitro* Experiment kein Effekt des MV auf das Differenzierungs- bzw. Proliferationspotential der HPC zu entdecken war, wurde untersucht, ob die MV-Exposition im *in vivo* Experiment einen Einfluss auf HS/PC hat. 2×10^5 HS/PC wurden 1 h MOCK oder wildtypischem WTF ausgesetzt und anschließend in NOD/SCID-IL2R γ ^{-/-}-Mäusen transplantiert, die zuvor mit einer Strahlendosis von 2,5 Gy subletal bestrahlt wurden. 12 Wochen nach der Transplantation wurden das Knochenmark (aus beiden Oberschenkelknochen und Schienbeinen) und die Milz präpariert. Von beiden Organen wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt und der Anteil humaner Leukozyten mittels Detektion von humanem CD45 durchflusszytometrisch bestimmt. Zusätzlich wurde ebenfalls der Anteil humaner B-Zellen und humaner, myeloider Zellen durch die Detektion der humanen Oberflächenmoleküle CD19 bzw. CD14 in beiden Organen bestimmt. Die Rekonstitutionsrate, d. h. der Anteil an humanen Leukozyten, lag im Knochenmark zwischen 68 - 95 % und in der Milz zwischen 73 - 88 %. Der Anteil humaner B-Zellen lag im Knochenmark zwischen 34 % - 48 % und in der Milz zwischen 65 - 76 %. Humane myeloide Zellen (CD14⁺) erreichten im Knochenmark einen Anteil von 4 - 8 % und stellten in der Milz weniger als 0,5 % der Zellen dar. Normalisiert man die Werte indem man das jeweilige MOCK-Experiment als 100 % setzt, ist kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Rekonstitution von Mäusen, die MOCK-exponierte Zellen und solchen, die MV-exponierte Zellen injiziert bekamen zu detektieren (Abb.: 4.20 a). Dies galt sowohl für das Knochenmark als auch für die Milz der jeweiligen Tiere. Desweiteren gab es ebenfalls keinen messbaren Unterschied bezüglich der Anzahl an CD14⁺- (Abb.: 4.20 b) bzw. CD19⁺-Zellen (Abb.: 4.20 c) zwischen den MOCK- und den WTF-Experimenten in den beiden Organen. Eine Exposition mit wildtypischem MV hat demzufolge keine Auswirkung auf die Fähigkeit der Langzeitrekonstitution von HS/PC.

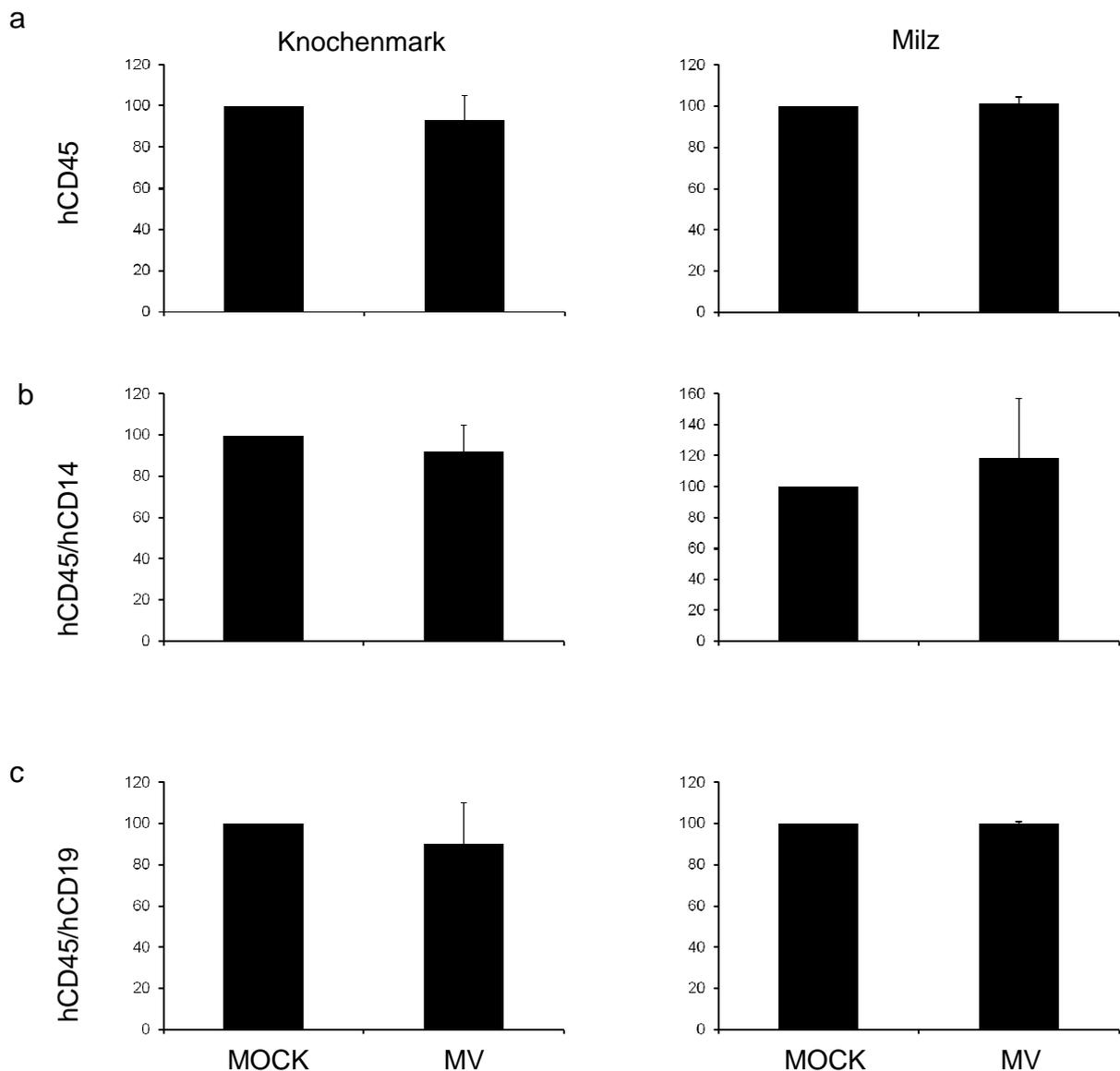


Abb. 4.20: Langzeitrekonstitution von NOD/SCID-Mäusen durch HS/PC nach MV-Exposition

Je 2×10^5 HS/PC wurden für 1 h MOCK- bzw. MV-exponiert und dann in subletal bestrahlte NOD/SCID-IL2R $\gamma^{-/-}$ -Mäusen transplantiert. 12 Wochen nach der Transplantation wurden das Knochenmark und die Milz auf die Präsenz von a) humanen Leukozyten (CD45 $^{+}$), b) humanen myeloiden Zellen (CD14 $^{+}$) und c) humanen B-Zellen (CD19 $^{+}$) hin durchflusszytometrisch untersucht. Die Werte des jeweiligen MOCK-Experiments wurden als 100 % gesetzt. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten.

4.3.1 MV-Exposition inhibiert die Kurzzeitrekstitution *in vivo*

Wie in 4.2 beschrieben ist die 12wöchige Langzeitrekstitution hauptsächlich auf HSC im Ausgangsmaterial zurückzuführen. HPC tragen nur in den ersten zwei Wochen zur Rekstitution des Knochenmarks in bestrahlten Mäusen bei. Tochterzellen, deren Ursprung in den transplantierten HPC liegt, gehen nach 2 Wochen in Apoptose (Kerre et al, 2001). Ein Effekt des MV auf die HPC *in vivo* wäre deshalb nur früh nach der Transplantation der Zellen zu sehen sein. Um einen solchen Effekt zu untersuchen, wurde das Knochenmark transplantiert Mäuse bereits 7 Tage nach der Transplantation analysiert. Zuvor wurden die Mäuse mit $1-2 \times 10^5$ HS/PC transplantiert, die zuvor erneut mit einer M.O.I. von 5 WTF- oder MOCK-exponiert wurden. Da der zu erwartende Anteil humaner Zellen nach nur einer Woche gering war, wurden in diesem Experiment nicht wie üblich 2×10^5 Ereignisse, sondern 5×10^5 pro Probe durchflusszytometrisch gemessen. Desweiteren wurde aufgrund der kurzen Zeitspanne von 7 Tagen auf eine Detektion entstandener

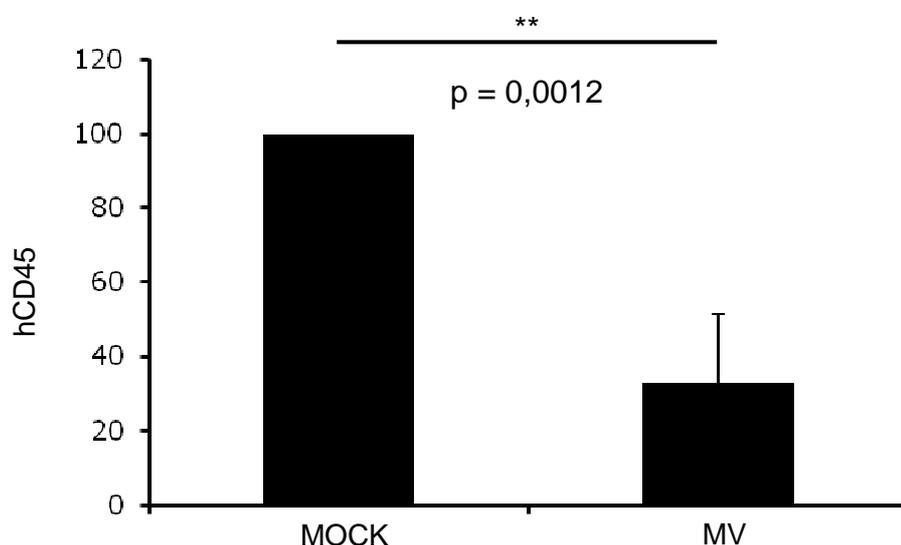


Abb. 4.21: Kurzzeitrekstitution von NOD/SCID-Mäusen durch HS/PC nach MV-Exposition

$1-2 \times 10^5$ HS/PC wurden für 1 h MOCK- bzw. MV-exponiert und dann in subletal bestrahlte NOD/SCID-IL2R $\gamma^{-/-}$ -Mäusen transplantiert. 1 Woche nach der Transplantation wurde das Knochenmark auf die Präsenz von humanen Leukozyten (CD45 $^{+}$) hin analysiert. Die Werte der jeweiligen MOCK-Kontrolle wurden als 100 % definiert. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen 5 unabhängiger Experimente.

B-Zellen und myeloider Zellen verzichtet und nur die gesamte humane Leukozytenpopulation analysiert. In der Tat lag der Anteil an humanen Leukozyten im murinen Knochenmark nach einer Woche nur zwischen 1-12 %. Im Vergleich zur MOCK-Kontrolle war die Kurzzeitrekstitution der Mäuse innerhalb der ersten Woche stark gehemmt. Der Anteil humaner Leukozyten (CD45⁺) im murinen Knochenmark war bei Mäusen, die MV-exponierte HS/PC injiziert bekamen, um 67,01 % reduziert (Abb.: 4.21). Dieser Unterschied in der Kurzzeitrekstitution ist mit einem p-Wert von 0,0012 statistisch höchst signifikant.

4.3.1 Die Migration der HS/PC *in vivo* wird durch MV nicht beeinträchtigt

Ein Unterschied in der Kurzzeitrekstitution, wie er in 4.6.2 gemessen wurde, kann verschiedene Ursachen haben. Er kann unter anderem dadurch entstehen, dass MV-exponierte HS/PC nach Injektion in die Schwanzvene in geringerer Zahl zum Knochenmark migrieren. Einmal in den Blutstrom injiziert migrieren HS/PC ins Knochenmark und die lymphatischen Organe. Hauptsächlich wird diese Migration vom Chemokin CXCL12, auch bekannt als *stroma cell derived factor-1* (SDF-1), gesteuert, das von Stromazellen sekretiert wird (Dar et al, 2006). Die HS/PC exprimieren auf ihrer Oberfläche den SDF-1-Rezeptor CXCR4, dessen Bindung die Zellen in Richtung der höheren SDF-1-Konzentration migrieren lässt. Die zusätzliche Hochregulierung und Aktivierung von Adhäsionsmolekülen ermöglicht es den Zellen, an den Endothelzellen der Blutgefäße zu adhären und anschließend durch die Gefäßwand ins Zielorgan zu migrieren. So im Knochenmark angekommen, nisten sich die HSC in ihrer Nische ein während die HPC durch Proliferation und Differenzierung den Bestand an Blutzellen erneuern bzw. wieder herstellen. Eine erheblich geringere Anzahl an HS/PC, die ins Knochenmark migrierten, würde sich auf die Effizienz der Kurzzeitrekstitution auswirken. Um diese Hypothese zu untersuchen wurde das Knochenmark und die Milz transplantierter Mäuse 40 h nach Injektion analysiert. Den bestrahlten Mäusen wurden je $3,5-5 \times 10^5$ MOCK- bzw. WTF-exponierte HS/PC injiziert. Nach 40 h sollte der Großteil der migrationsfähigen HS/PC im Zielorgan angekommen sein, aber sich noch nicht geteilt haben. Erneut wurden das Knochenmark (aus beiden Oberschenkelknochen und Schienbeinen) und die Milz präpariert und der Prozentsatz an humanen CD45⁺-Leukozyten durchflusszytometrisch ermittelt. Da der Anteil an humanen Zellen 40 h nach der

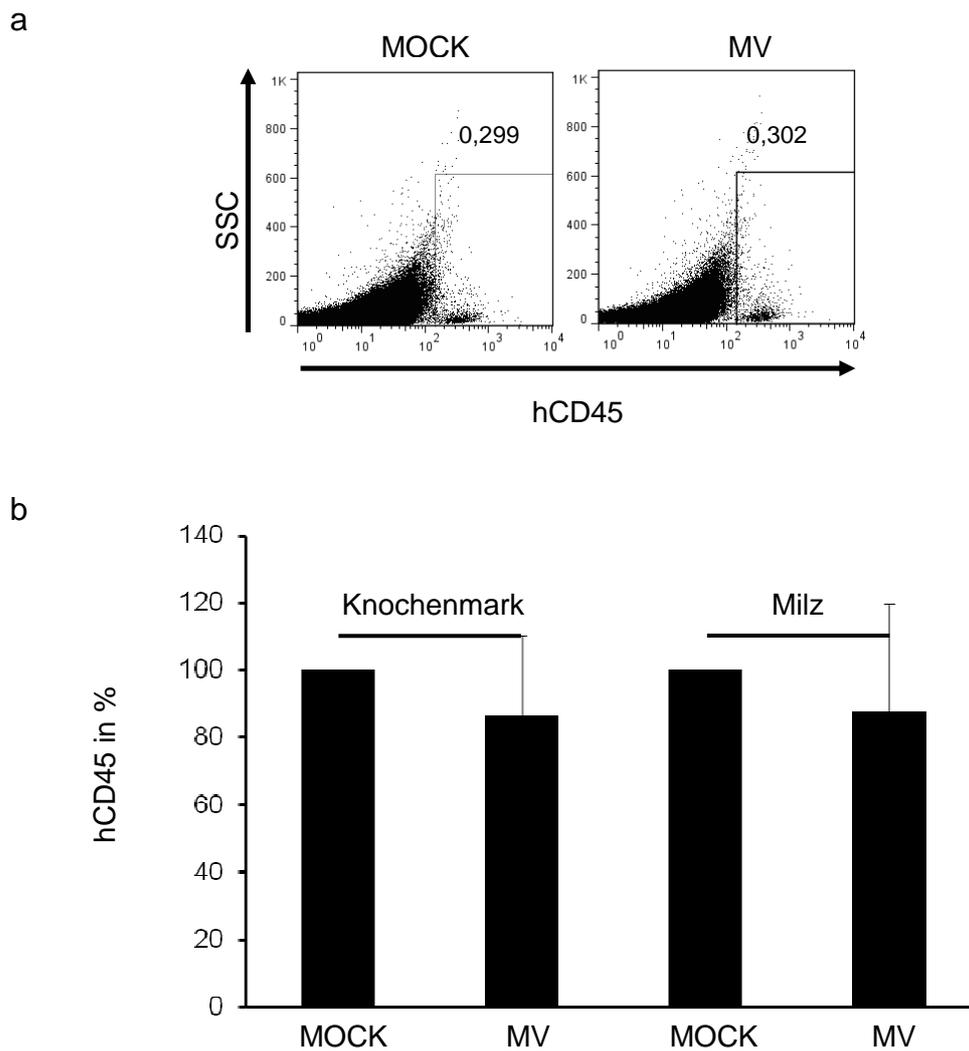


Abb. 4.22: Detektion humane Leukozyten im Knochenmark 40 h nach der Transplantation

HS/PC wurden für 1 h WTF- bzw. MOCK-exponiert und dann in subletal bestrahlte NOD/SCID-IL2R $\gamma^{-/-}$ -Mäusen transplantiert. Nach 40 h wurden humane Leukozyten (hCD45⁺) in Einzelzellsuspensionen aus dem Knochenmark und der Milz durchflusszytometrisch detektiert. a) Beispiel einer Messung von Knochenmarkszellen einer Maus, die MOCK-exponierte Zellen injiziert bekam (linkes Bild) und einer, die WTF-exponierte Zellen injiziert bekam (rechtes Bild). b) Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen dreier unabhängiger Experimente. Die Werte der jeweiligen MOCK-Experimente wurden als 100 % gesetzt.

Transplantation bei unter einem halben Prozent lag, wurden mindestens 7×10^5 Ereignisse im Durchflusszytometer gemessen, um eine ausreichende Anzahl humaner Zellen zu detektieren (Bsp.: 4.22). Die Exposition zu MV hatte keinerlei Effekt auf die Migration der HS/PC. Sowohl in Mäusen die virusexponierte HS/PC injiziert bekamen, als auch in den MOCK-Experimenten war nach 40 h die gemessene Anzahl an humanen Leukozyten im Knochenmark, als auch in der Milz vergleichbar. Auch eine statistische Analyse der gemessenen Daten zeigte, dass es keinen signifikanten Unterschied gab (Abb.: 4.23). Man kann demnach ein schlechteres *homing* ins lymphatische Gewebe und damit letztlich in die Nische im Knochenmark als Ursache für die reduzierte Kurzzeitrekstitution ausschließen.

5 Diskussion

Die während der Masern auftretende und darüber hinaus andauernde generelle und transiente Immunsuppression ist ursächlich für viele masernbedingte Komplikationen und die immer noch hohe Mortalitätsrate. Kennzeichnend für diese sind unter anderem eine auftretende Lymphopenie in der Peripherie, eine Suppression der zellulären Immunantwort und der Verlust des Expansionspotentials bei T-Zellen *ex vivo* nach Stimulation durch antigenpräsentierende Zellen (Avota et al, 2010). Neben diesen Effekten könnte eine Suppression von Knochenmarkszellen und damit letztlich eine Inhibition der Hämatopoese für das weitere Verständnis der MV-induzierten Immunsuppression von entscheidender Bedeutung sein. Das bisherige Wissen über die Interaktion zwischen MV und Zellen des Knochenmarks beschränkt sich bisher auf die Ergebnisse einer Studie, die dieses Thema *in vitro* untersucht (Manchester et al, 2002) und hierbei für die Untersuchungen einen dualtrophen MV-Stamm eingesetzt hat. Nun ist jedoch das wildtypische und humanpathogene MV in seinem Tropismus auf den Rezeptor CD150 beschränkt und nicht in der Lage, CD46 als Rezeptor zu benutzen. Dualtrope MV-Stämme hingegen sind attenuiert und eine Infektion mit diesen verursacht weder Masern noch eine Immunsuppression (Yanagi et al, 2006). Im Gegenteil, im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass das attenuierte MV in Makaken nach einer Infektion über die Atemwege nur in den ersten Tagen lokal Zellen infiziert, bevor es vom Immunsystem erfolgreich eliminiert wird. Im Gegensatz zur Infektion mit einem Wildtypstamm kommt es nicht zu einer massiven Infektion von Lymphozyten, was letztlich zu einer systemischen Infektion des Organismus führt (de Vries et al, 2010). Neben der fehlenden Pathogenität dualtroper Stämme ist der Einsatz dieser Stämme auch aufgrund ihres Zelltropismus ungeeignet. Zwar wurde im Tiermodell gezeigt, dass auch dualtrope Stämme zunächst *in vivo* ausschließlich CD150⁺-Zellen infizieren (de Vries et al, 2010), doch infizieren sie in *in vitro*-Experimenten erfolgreich alle humanen CD150⁻/CD46⁺-Zellen (Yanagi et al, 2006). CD46 wird auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert (Liszewski et al, 1991), sodass im *in vitro*-Experiment beobachtete Infektionen und Effekte kaum Rückschlüsse auf die Situation während der Masern zulassen. In der Tat konnte gezeigt werden, dass die beiden Rezeptoren sehr ungleichmäßig von Knochenmarkszellen exprimiert werden. Während Knochenmarksstromazellen

CD46, aber nicht CD150 exprimieren (Abb.: 4.10 und 4.11), exprimieren alle HS/PC CD46 und nur ca. 5 % CD150 (Abb.: 4.6a). Ein weiterer Beweggrund für die erneute Untersuchung der Interaktion zwischen MV und Knochenmarkszellen war die Entdeckung des SLAM-codes 2005 (Kiel et al, 2005). Der SLAM-code beschreibt die differentielle Expression der drei SLAM-Familienmitglieder CD150, CD244 und CD48 während der murinen Hämatopoese. Das im Menschen als MV-Rezeptor fungierende Protein CD150 wird im murinen HS/PC-Kompartiment ausschließlich auf hämatopoetischen Stammzellen exprimiert. In ihrer Differenzierung weiter fortgeschrittene, multipotente Vorläuferzellen exprimieren ausschließlich CD244 und die am weitesten differenzierten oligopotenten Vorläuferzellen CD244 und CD48. Die Entdeckung von Oberflächenmarkern, die exklusiv von Stamm- oder Vorläuferzellen exprimiert werden, spielt nicht nur für die Forschung, sondern, insbesondere mit Blick auf die Stammzelltherapie, auch für die Behandlung von Leukämieerkrankungen eine wichtige Rolle. Ziel hierbei ist es zur Minimierung von Spender-gegen-Wirt-Reaktionen aus dem Spendermaterial für eine Transplantation Stammzellen so gut und rein wie möglich zu isolieren (Roncarolo et al, 2011). Im humanen System benutzt man bisher hauptsächlich drei Marker zur Identifizierung von HS/PC. Die beiden Marker CD34 und CD133, die auch zur Anreicherung von HS/PC benutzt werden, markieren jeweils ein Kompartiment, in dem HS/PC hoch angereichert sind (Andrews et al, 1986; Civin et al, 1984; Miraglia et al, 1997; Yin et al, 1997). Diese beiden Populationen sind nicht vollständig identisch, sondern überschneiden sich bis zu etwa 75% (Boxall et al, 2009; de Wynter et al, 1998). Trotzdem werden beide Marker gleichwertig für die Isolierung von HS/PC benutzt. Die Isolierung über einen der beiden Marker erlaubt jedoch noch keine Differenzierung zwischen Stamm- und Vorläuferzellen. Zusätzlich kann man diese Populationen in eine CD38⁺-, in der hauptsächlich Vorläuferzellen angereichert sind, und eine CD38⁻-Subpopulation, in der Stammzellen 1000-fach angereichert sind, unterteilen. Trotz der hohen Anreicherung von HSC durch den Ausschluss CD38⁺-Zellen handelt es sich trotzdem nicht um eine reine HSC-Fraktion (Xiao & Dooley, 2000). Ein Marker, der ganz gezielt humane HSC identifiziert, ist jedoch noch nicht bekannt. Ebenso wenig gibt es die Möglichkeit, mittels Oberflächenmarkern zwischen humanen, multipotenten und oligopotenten Vorläuferzellen zu unterscheiden. Der für die Isolierung muriner HSC erfolgreich etablierte SLAM-code kann hierfür nicht herangezogen werden. Bei

humanen HS/PC konnten zwar verschiedene Subpopulationen nachgewiesen werden, die jeweils einen der drei Marker exprimieren (Abb.: 4.2), allerdings unterschied sich das Expressionsmuster bezüglich der gesamten HS/PC-Population vom *SLAM-code*. Im Gegensatz zu murinen HS/PC konnten humane HS/PC detektiert werden, die CD150 entweder mit CD244 oder CD48 koexprimieren (Abb.: 4.3a). Beide Kombinationen entsprechen nicht dem Expressionsmuster während der murinen Hämatopoese. Im Gegenteil, besonders die Koexpression der beiden Marker CD150 und CD48 widerspricht dem *SLAM-code*, da diese beiden Marker in der Maus Stammzellen von oligopotenten Vorläuferzellen unterscheiden. Des Weiteren wurden diese beiden Marker mit CD38 koexprimiert (Abb.: 4.3b). Ihre Zugehörigkeit zum CD34⁺/CD38⁺-Kompartiment ist ein starkes Indiz dafür, dass es sich bei diesen Zellen um Vorläuferzellen handelt und dies entspricht im Bezug auf die CD150-exprimierenden Zellen erneut nicht dem *SLAM-code*. Besonderes Augenmerk wurde in dieser Studie auf die, den MV-Rezeptor exprimierende, Subpopulation gerichtet. Die Expression von CD150 auf humanen HS/PC wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Während es Studien gibt (Larochelle et al, 2011; Manchester et al, 2002), deren Resultate sich mit den hier beschriebenen CD150-Messungen decken, konnte in einer weiteren Studie (Sintes et al, 2008) keine CD150-Expression detektiert werden. Der Grund für diese Diskrepanz konnte jedoch nicht ausgemacht werden. Es können sowohl der Antikörper, da der gleiche Klon verwendet wurde, als auch die Anreicherung im Falle von Nabelschnurblut ausgeschlossen werden. Da die Anreicherung der HS/PC aus mobilisiertem, peripherem Blut in der besagten Studie über das Antigen CD133 und nicht, wie in dieser Arbeit, über CD34 lief, wurde auch dies als Grund ausgeschlossen (Abb.: 4.2b). Bezüglich der Expression der drei *SLAM-code*-Marker spielt es keine Rolle, ob man CD34 oder CD133 als HS/PC-Marker mit detektiert. CD244 wird ohnehin von fast 100% der HS/PC exprimiert (Abb.: 4.2a) und die Frequenz der CD150⁺- bzw. CD48⁺-Zellen unterscheidet sich für die beiden Marker nicht (Abb.: 4.2b). Da durch die Anzahl getesteter Proben (72) eine ausreichende Teststärke gewährleistet ist und aufgrund der Übereinstimmung mit Messungen in anderen Studien, kann es letztendlich jedoch als erwiesen angesehen werden, dass eine Subpopulation humaner HS/PCs CD150 exprimiert. Die dargestellten Daten zur Phänotypisierung basieren auf Messungen an 54 Proben, die aus Nabelschnurblut stammten, und 18

aus Leukaphereseprodukten mobilisierter Leukämiepatienten, die ursprünglich für eine autologe Stammzelltransplantation vorgesehen waren. Es ist davon auszugehen, dass die HS/PC-Populationen aus den Leukapheresepreparaten neben gesunden auch leukämische Stamm- und Vorläuferzellen (LS/PC) enthielten. Myeloide Leukämien sind, ähnlich dem hämatopoetischen System, hierarchisch aufgebaut. Während es sich bei dem Großteil der leukämischen Zellen um Blasten handelt, die nicht in der Lage sind, in immunsupprimierten NOD/SCID-Mäusen eine Leukämie zu etablieren, gibt es einen kleinen Anteil an LS/PC, die dazu kurzzeitig (LPC) bzw. langfristig (LSC) in der Lage sind (Testa, 2011). Das Proliferationsverhalten der LS/PC ähnelt dem gesunder HS/PC. Dies bedeutet, dass es ruhende LSC gibt, die bei Bedarf differenzieren können und LPC, die das stammzelltypische Selbsterneuerungspotential bereits verloren haben. Weiterhin stimmt das CD34-/CD38-Expressionmuster bei einigen myeloiden Leukämien mit dem typischen HS/PC-Expressionsmuster überein (Testa, 2011). Da bezüglich des Expressionsmusters der drei SLAM-code-Marker kein Unterschied zwischen den beiden Ausgangsmaterialien detektiert wurde, kann davon ausgegangen werden, dass LS/PC ebenfalls alle CD244 exprimieren und jeweils eine Subpopulation der LPC die Marker CD150 und CD48 (Tab.: 4.1).

Die als HPC phänotypisierten CD34⁺/CD150⁺-Zellen unterscheiden sich funktionell in *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten nur quantitativ und nicht qualitativ von den HPC in der CD150⁻-Fraktion. So ist ihre Fähigkeit, im CFA zu verschiedenen myeloiden und zu erythroiden Kolonien heranzuwachsen, genau so ausgeprägt wie bei CD34⁺/CD150⁻-HS/PC. Allerdings reifen aus der gleichen Anzahl ausgesäter Zellen nur etwa halb so viele Kolonien aus CD150⁺-HPC (Abb.: 4.4). Dieser Unterschied ist zwar nur im Falle der myeloiden Kolonien statistisch signifikant, konnte aber in einer ähnlichen Studie bestätigt werden (Larochelle et al, 2011). HSC tragen in diesem Versuchsaufbau nicht zur Kolonienbildung bei, da die 14-tägige Inkubationszeit nicht ausreicht, um aus HSC zu kolonienbildenden Vorläuferzellen zu differenzieren. Auch in der Langzeitrekonstitution von bestrahlten NOD/SCID-IL2R γ ^{-/-}-Mäusen konnte nur ein quantitativer Unterschied zwischen den beiden Fraktionen festgestellt werden (Abb.: 4.5). Ein qualitativer Unterschied bezüglich des Differenzierungspotentials zeigte sich nicht. Beide Fraktionen sind in der Lage, sowohl in Zellen der myeloiden

als auch lymphoiden Linie zu differenzieren, was anhand der beiden Marker CD14 und CD19 nachgewiesen wurde. Nach 12 Wochen war jedoch der Anteil an humanen Zellen, vor allem im Knochenmark, geringer wenn die Maus CD150⁺-Zellen transplantiert bekam. Dieser ineffizientere Langzeitrekonstitution ist aber nicht nur auf einen Unterschied zwischen den Vorläuferzellen in den beiden Fraktionen, sondern vor allem auf das Fehlen von HSC in der CD150⁺-Fraktion zurückzuführen. Während der Rekonstitution der murinen Hämatopoese tragen HPC nur in den ersten zwei Wochen zur Repopulation des murinen hämatopoetischen Kompartiments bei, bevor sie und ihre Tochterzellen durch apoptotischen Zerfall immer weniger werden (Kerre et al, 2001). Die Langzeitrekonstitution wird maßgeblich durch die in der transplantierten Zellpopulation enthaltenen Stammzellen bewirkt. Die schlechtere Langzeitrekonstitution durch CD34⁺/CD150⁺-Zellen bestätigt also das Ergebnis der Phänotypisierung, dass es sich bei dieser Subpopulation um Vorläuferzellen handelt. Dieser Befund wurde in einem ähnlichen Experiment in einer kürzlich veröffentlichten Studie bestätigt (Larochelle et al, 2011).

Die Existenz CD150⁺ HPCs warf die Frage nach der Infizierbarkeit von HS/PC mit wildtypischem MV und dem Unterschied zur Infektion mit einem dualtropen Stamm auf. In der Tat unterscheiden sich die Infektionsraten höchst signifikant voneinander (Abb.: 4.6b). Wie das Expressionsmuster der jeweiligen Rezeptoren CD46 und CD150 erwarten ließ, war die Infektion mit dem ED-eGFP viel effizienter als mit dem wildtypischen Stamm IC323-eGFP. Die in dieser Arbeit detektierte Infektionsrate von 61.65% des ED-eGFP-Stamms bei einer eingesetzten M.O.I. von 5 ist zwar etwas höher als die Rate von 12 % bei einer M.O.I. von 2 in der bereits zitierten Studie (Manchester et al, 2002), jedoch ist dies wohl auf die unterschiedliche Infektiosität der verwendeten dualtropen Stämme zurückzuführen. Wie von denselben Autoren in einer anderen Studie bereits diskutiert, ist die Infektion via CD46 von adaptierten Laborstämmen wie ED-eGFP effizienter als bei dem in der Studie benutzten Stamm MV-JW (Manchester et al, 2000). Die Infektionsrate mit einem Wildtypstamm, der strikt CD150-trop ist, ist allerdings wesentlich geringer als mit dualtropen Stämmen. Die Vermutung, dass es sich bei den mit dem Wildtypstamm infizierten Zellen um CD150⁺-HPC handelte, lag nahe, da in den jeweiligen Infektionsversuchen die Infektionsrate ungefähr der Rate an CD150⁺-HPC in der Gesamtpopulation

entsprach. Um diese Vermutung genauer zu untersuchen, wurden CD150⁻-HS/PC und CD150⁺-HPC getrennt voneinander infiziert. Die geringe Anzahl an CD150⁺-HPC machte eine durchflusszytometrische Analyse der Infektionsrate leider nicht möglich, sodass die Zellen nach der Infektion im CFA eingesetzt wurden. Die hierbei entstandenen Kolonien wurden fluoreszenzmikroskopisch auf eGFP-Expression hin untersucht. Der Wildtypstamm IC323-eGFP war hierbei in der Lage Zellen in beiden Fraktionen zu infizieren. Nun ist es vom wildtypischen MV bekannt, dass es *in vitro* und *in vivo* auch CD150⁻-Zellen zumindest in einem geringen Maße infizieren kann (Andres et al, 2003; de Vries et al, 2010; Hashimoto et al, 2002; Kimura et al, 1975; McChesney et al, 1997; Sakaguchi et al, 1986). Interessant an diesem Versuch war jedoch, dass kein Unterschied in der Infektion zwischen den beiden Fraktionen zu beobachten war. Aus Zellen beider Fraktionen reiften Vorläuferkolonien heran, die alle eGFP-negativ, jedoch von kleineren, eGFP-positiven Satellitenkolonien umgeben waren (Abb.: 4.7). Diese CD150-unabhängige Infektion lässt vermuten, dass es einen weiteren Rezeptor für MV bei HS/PC gibt. Eine Schlussfolgerung, die auch für den Stamm MV-JW von den Autoren nahegelegt wurde, nachdem sie die Infektionsrate durch blockierende Antikörper gegen CD150 und CD46 nur um Faktor 10 verringern, aber die Infektion nicht komplett inhibieren konnten (Manchester et al, 2002). Die in beiden Fraktionen beobachteten Satelliten waren morphologisch keiner ausgereiften Vorläuferkolonie zuzuordnen. Sie waren viel kleiner als echte Kolonien und hatten, selbst wenn sie eine erythroide Kolonie umgaben, kein Hämoglobin gebildet, das sie hätte rot erscheinen lassen. Es war in dieser Arbeit nicht zu klären, ob es sich bei diesen Satelliten um frühe Abspaltungen von echten Kolonien handelte oder ob es sich ursprünglich um infizierte HPC handelte, die in ihrem Wachstum zur Kolonie arretierten. Die Anzahl an Kolonien war, wie im Folgenden noch genauer diskutiert wird, durch die vorrangegangene Exposition zu MV nicht beeinträchtigt. MV-exponierte HS/PC bildeten genauso viele Kolonien wie MOCK-exponierte HS/PC (Abb.: 4.19).

Da die Infektion in beiden Fraktionen nachgewiesen werden konnte, wurden die anschließenden Analysen wieder mit unfraktionierten HS/PC durchgeführt. Der für das MV typische lytische Verlauf der Infektion sollte, wie bei anderen Zellen und Zelllinien, nach 2 Tagen zum vermehrten Vorkommen toter Zellen führen. Es konnte

jedoch, wie bereits für den in der Literatur beschriebenen Stamm MV-JW, kein vermehrter Zelltod nach 2 Tagen mit den hier verwendeten Stämmen festgestellt werden (Abb.: 4.8a). Weder in wildtypischen noch in attenuierten MV-exponierten Zellpopulationen stieg die Anzahl 7AAD-positiver Zellen. Da das Tiermodell gezeigt hat, dass attenuiertes MV *in vivo* zum einen den gleichen Tropismus wie wildtypisches besitzt und des Weiteren nur in den ersten Tagen nach Infektion nachweisbar ist (de Vries et al, 2010), wurde nur für das wildtypische MV überprüft, ob sich die Anzahl toter Zellen über einen längeren Zeitraum nach der Infektion von MOCK-exponierten HS/PC unterscheidet. In diesem Fall wurde, wie immer, wenn die Infektion nicht visualisiert werden sollte, der Wildtypstamm WTF benutzt, der denselben Tropismus wie IC323-eGFP aufweist. Ein Unterschied bezüglich der Viabilität ist jedoch auch nach einer 6-tägigen Kultivierung nicht zu beobachten (Abb.: 4.8b). Zu diesem Befund passend konnte auch nach WTF-Exposition kein Unterschied in der Proliferationsrate verglichen mit MOCK-exponierten HS/PC detektiert werden (Abb.: 4.8c). Die CFSE-gefärbten HS/PC wurden 2 bzw. 6 Tage nach der Exposition auf den Verlust von Fluoreszenzintensität hin untersucht und dieser war sowohl nach WTF- als auch nach MOCK-Exposition gleich stark. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen der Viabilitätsüberprüfung nach MV-JW-Exposition überein (Manchester et al, 2002). Die ungestörte Proliferation lässt darauf schließen, dass es zumindest *in vitro* nach MV-Kontakt bei HS/PC nicht wie bei Lymphozyten zur Interferenz des Phosphatidylinositol-3-Kinase/AKT-Signalwegs kommt, was bei Lymphozyten zum Proliferationsarrest führt (Avota et al, 2001).

Die Viabilität und das Proliferationsverhalten von HS/PC hängt *in vivo* unter anderem von der Nische ab, die sich im Knochenmark befindet. Hier bilden Knochenmarksstromazellen die natürliche Umgebung von HS/PC und schaffen durch den direkten Zell-Zell-Kontakt und die Sekretion von Zytokinen eine Umwelt, in der HSC im undifferenzierten Ruhezustand verharren können, aber auch, wenn nötig proliferieren, wobei entweder neue HSC entstehen oder die Differenzierung in HPC initiiert wird, die dann weiter in die verschiedenen Blutzelllinien differenzieren (Carlesso & Cardoso, 2010; Greenberger, 1991). Aufgrund dieser großen Bedeutung der Knochenmarksstromazellen für die Hämatopoese ist es unerlässlich, auch die Interaktion dieser Zellen mit MV im Zusammenhang mit der MV-induzierten

Immunsuppression zu untersuchen. Wie bereits diskutiert exprimieren Knochenmarksstromazellen den Wildtyprezeptor CD150 nicht (Abb.: 4.10 und 4.11) und so zeigt sich auch ein deutlicher Unterschied zwischen der Infektionseffizienz der beiden Stämme ED-eGFP und IC323-eGFP (Abb.: 4.9). Der attenuierte Stamm ED-eGFP infiziert im Gegensatz zum Wildtypstamm IC323-eGFP Knochenmarksstromazellen sehr effizient, sodass bereits nach 3 Tagen die gesamte Kultur infiziert ist. Die Infektion breitet sich schnell über die Kultur aus und verläuft zytolytisch. Ganz anderes ist der Infektionsverlauf mit wildtypischem IC323-eGFP. Dieser Stamm, der im Gegensatz zu ED-eGFP nicht auf Zellen trifft, die den benötigten Rezeptor exprimieren, infiziert Knochenmarksstromazellen viel ineffizienter. Weiterhin etabliert sich eine persistierende Infektion, bei der selbst nach 20 Tagen nur ein Teil des Stromas infiziert ist und die infizierten Zellen noch vital sind. Die lytische Infektion der Stromazellen durch den ED-eGFP-Stamm scheint in der CD46-abhängigen Infektion begründet zu sein. Wie die Blockierung der Infektion durch Antikörper gezeigt hat, ist die massive Infektion mit ED-eGFP CD46-vermittelt, während die schwache Infektion mit IC323-eGFP selbstverständlich CD150-unabhängig verläuft. Des Weiteren ist zu beobachten, dass sich durch das Blockieren des CD46 die Infektion durch ED-eGFP nicht komplett inhibieren lässt. Es kommt weiterhin zur Infektion, nur gleicht deren weiterer Verlauf in Anwesenheit von anti-CD46-Antikörpern dem zuvor bei IC323-eGFP beobachtetem. Es kommt nicht zur zytolytischen, sondern zur persistierenden Infektion durch ED-eGFP. Wie bereits zuvor bei HS/PC beobachtet, kommt es *in vitro* zu erheblichen Unterschieden zwischen der Infektion mit einem CD150-tropen und einem dualtropen MV-Stamm. Diese Befunde verdeutlichen die Wichtigkeit des Einsatzes wildtypischer Stämme zur Untersuchung der Interaktion von MV mit Knochenmarkszellen. Attenuierte Stämme stellen aufgrund der signifikant höheren Infektionsrate und des abweichenden Infektionsverlaufs in diesem Forschungsfeld kein adäquates Modell dar. Dies wird deutlicher, wenn man die Unterschiede zwischen diesen beiden Stämmen, aber auch zwischen dem Wildtyp und dem in der Literatur beschriebenen dualtropen MV-JW, in Kokulturen mit HS/PC betrachtet. Beide Stämme können von infizierten Knochenmarksstromazellen zu nicht infizierten HS/PC, aber auch in die entgegengesetzte Richtung in Kokulturen übertragen werden. Hierbei ist nicht nur die Infektionsrate bei beiden Zelltypen mit ED-eGFP erneut höher als mit IC323-eGFP,

sondern auch die Transmission des Virus effizienter im Falle des attenuierten Stamms. Trotzdem ist auch die Virustransmission des Wildtypstamms IC323-eGFP von Knochenmarksstromazellen zu HS/PC bzw. von HS/PC zu Knochenmarksstromazellen innerhalb der ersten 5 Tage nach Infektion und anschließendem Beginn der Kokultur klar detektierbar. Nach 12 Tagen Kokultivierung ist im Gegensatz zu IC323-eGFP bei ED-eGFP-infizierten Kokulturen eine massive Zerstörung des Stromas und damit einhergehend eine starke Reduktion der HS/PC-Zahl zu beobachten. Während IC323-eGFP *in vitro* erneut persistiert, verläuft die Infektion mit ED-eGFP so, wie es in der Literatur bereits für das dualtrope MV-JW beschrieben wurde (Manchester et al, 2002). Es ist wohl erneut der höheren Infektiosität via CD46 des ED-Stamms geschuldet, dass dieser Effekt der lytischen Zerstörung im Falle der ED-eGFP-Infektion bereits nach ca. 2 Wochen und nicht erst nach 5 Wochen eintritt, wie es bei MV-JW der Fall ist (Manchester et al, 2002). Festzuhalten bleibt, dass es eine Diskrepanz zwischen dem Verlauf der Experimente mit wildtypischem und attenuiertem MV gibt, die wohl hauptsächlich auf den Rezeptortropismus zurückzuführen ist. Solche durch den Gebrauch eines CD46-tropen Stamms entstandene Effekte, können jedoch als experimentelle Artefakte *in vitro* angesehen werden, die keine Rückschlüsse auf die Situation *in vivo* während der Masernerkrankung zulassen. Die bei Gebrauch dualtroper Stämme beobachtete Beeinträchtigung von HS/PC in Kokulturen ist deshalb wohl eher auf die Zerstörung des Stromas und den damit einhergehenden Verlust an HS/PC-Unterstützung zurückzuführen als auf ein MV-induziertes Signal, das in der Studie mit MV-JW postuliert wurde (Manchester et al, 2002). Wie bereits beschrieben konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass attenuierte, dualtrope Stämme weder einen Organismus systemisch infizieren können, noch *in vivo* CD46 als Rezeptor benutzen (de Vries et al, 2010). Aufgrund der fehlenden Relevanz der Experimente mit attenuiertem, dualtropem MV für die Situation *in vivo*, wurden alle nachfolgenden Experimente nur noch mit den wildtypischen Stämmen IC323-eGFP und WTF durchgeführt. Der persistierende Charakter der Infektion mit dem wildtypischem IC323-eGFP ist besonders im Hinblick auf die Spätfolge der Masern, die subakute sklerosierende Panenzephalitis (SSPE), interessant. Diese Spätfolge wird durch persistierende Masernviren im Zentralnervensystem verursacht. Hierbei handelt es sich um mutierte Varianten des ursprünglichen Virus, das den Organismus infiziert hat. Besonders in den Genen des

M-Proteins und des zytoplasmatischen Teil des F-Proteins kommen Hypermutationen vor, die dazu führen, dass sowohl Viruspartikel nicht mehr freigesetzt werden, als auch Zell-Zell-Fusion ausbleibt (Baczko et al, 1986; Cattaneo et al, 1987a; Cattaneo et al, 1987b). Nach aktuellem Kenntnisstand wird eine SSPE unter anderem durch eine Infektion im Säuglingsalter, eine genetischen Prädisposition, eine Inteferonantwort in Gliazellen bei möglicherweise fehlender Interferonantwort in Neuronen, hohe Antikörpertiter und die Akkumulation von Mutationen im Virusgenom begünstigt (Reuter & Schneider-Schaulies, 2010). Es gibt zwar einige Ansätze, die Persistenz und die Ausbreitung des MV im zentralen Nervensystem (ZNS) zu verstehen, doch gibt es immer noch keine genaue Vorstellung davon, über welchen Pfad das MV ins Gehirn gelangt. Da alle untersuchten SSPE-Proben aus Autopsien oder Biopsien während der symptomatischen Phase stammen, ist nicht geklärt, ob das Virus von Beginn an im Nervensystem persistiert oder in einem anderen Gewebe und erst kurz vor der symptomatischen Phase das ZNS erreichte. Einige Studien, die dieses Thema behandelten, kommen zu widersprüchlichen Ergebnissen. Die Tatsache, dass die asymptomatische Phase in ihrer Dauer von Fall zu Fall stark variiert, hingegen aber eine MIBE immer einige wenige Monate nach den akuten Masern auftritt, kann sowohl so gedeutet werden, dass das Immunsystem die Infektion im ZNS unterschiedlich gut kontrollieren kann, als auch so, dass es je nach Patient unterschiedlich lange dauert bis die persistierende Infektion das ZNS erreicht. Zum jetzigen Zeitpunkt gilt diese Fragestellung als unbeantwortet und bedarf weiterer Forschung (Reuter & Schneider-Schaulies, 2010). Knochenmarksstromazellen sind bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht bezüglich einer Persistenz *in vivo* untersucht worden. Eine Persistenz im Knochenmark aus den *in vitro*-Daten der vorliegenden Arbeit abzuleiten scheint zwar, besonders aufgrund der räumlichen Nähe zum Zentralnervensystem in der Wirbelsäule, eine interessante Spekulation, ist jedoch in bisherigen Kohortenstudien nicht belegt wurden (Matthews et al, 2008; Sonoda et al, 2002). Es konnte zwar in einer der Studien virale RNA im Knochenmark erwachsener Personen nachgewiesen werden, jedoch ergab die Genotypisierung dieser RNA, dass es sich ausschließlich um einen aktuellen Genotypen handelte, der zur Zeit der Primärinfektion der untersuchten Personen nicht zirkulierte (Sonoda et al, 2002). Die Kohortenstudien widerlegen zwar eine kurze Persistenz des Virus im Knochenmark nicht, schließen aber die Möglichkeit aus, dass Knochenmarkszellen, wie es für

andere Viren beschrieben wurde, als Langzeitreservoir für MV dienen (Carter et al, 2010; Meggetto et al, 2001; Rezaee et al, 2010; Sundin et al, 2008). Damit ist auch eine spätere Reaktivierung des MV aus diesem Kompartiment, die z.B. während einer HIV-Infektion zur Leukopenie beiträgt, ausgeschlossen (Carter et al, 2010).

Eine essentielle Voraussetzung für eine Infektion von Knochenmarkszellen *in vivo* ist, dass das Virus Zugang zu diesem Organ hat. Die Studien im Tiermodell mit Makaken haben gezeigt, dass es während der Masern zur Infiltration des Knochenmarks mit infizierten Lymphozyten kommt. Einzelzellsuspensionen aus Knochenmark von Tieren, die 9 Tage zuvor mit IC323-eGFP infiziert wurden, enthielten infizierte T- und B-Zellen, die jeweils bis zu 5 % der jeweiligen Lymphozytenpopulation im Knochenmark repräsentierten (de Swart et al, 2007). Diese räumliche Nähe infizierter Lymphozyten zu Knochenmarkszellen stellt folglich einen Weg dar, über den das Virus diese Zellen erreichen könnte. In der Tat findet eine Transmission des wildtypischen IC323-eGFP von infizierten Lymphozyten zu Knochenmarkszellen *in vitro* statt. Die Kokultivierung von Knochenmarksstromazellen mit infizierten BJAB bzw. primären T-Zellen führt bereits innerhalb der ersten 24 h zur Infektion von Stromazellen, die sich im Laufe der Zeit langsam über die Stromakultur ausbreitet (Abb.: 4.16). Hierbei wurden im selben Zeitraum mehr Stromazellen durch infizierte T-Zellen als durch BJAB-Zellen infiziert. Weiterhin bedarf es für die Virustransmission keines direkten Kontakts zwischen den Stromazellen und Lymphozyten. Die Infektion wird auch von freigesetztem Virus übertragen. Eine Frage die besonders im Falle von Neuronen und Endothelzellen, die ebenfalls kein CD150 exprimieren, in der Literatur diskutiert wird. Da MV zum einen im Krankheitsverlauf den Organismus systemisch infiziert und damit auch Zellen die erwiesenermaßen CD150⁻ sind, aber zum anderen bisher nur CD150 als Rezeptor des Wildtyps bekannt ist, wird diskutiert, ob es einen weiteren Rezeptor auf CD150⁻-Zellen gibt und ob ein direkter Kontakt zwischen einer infizierten und einer uninfizierten Zelle für die Transmission essentiell ist (Allen et al, 1996; Andres et al, 2003; Duprex et al, 1999; Lawrence et al, 2000). Durch die räumliche Trennung der beiden Zellarten mittels Filter, durch die nur freies Virus diffundieren kann, konnte für Stromazellen allerdings gezeigt werden, dass *in vitro* die von den Lymphozyten freigesetzten Viruspartikel für eine Infektion der Stromazellen ausreichen (Abb.: 4.16). In diesem Falle dauerte es jedoch

mindestens 4 Tage bis zur Detektion erster infizierter Stromazellen und auch die nachfolgende Ausbreitung der Infektion war stark verlangsamt im Vergleich zur Kokultur mit direktem Kontakt zwischen den beiden Zelltypen. Abgesehen von der Virustransmission zu Stromazellen sind infizierte Lymphozyten auch in der Lage, MV in Kokultur auf HS/PC zu übertragen. Nach 48 h Kokultur mit infizierten T-Zellen oder B-JAB konnten in beiden Fällen im Durchschnitt ca. 20 % infizierte HS/PC detektiert werden. Der Unterschied zur Infektionsrate mit freiem Virus von 4,02 % ist dabei statistisch höchst signifikant. Betrachtet man diese äußerst effiziente Transmission des MV von infizierten Lymphozyten zu Knochenmarkszellen zusammen mit den Befunden aus dem Tiermodell (de Swart et al, 2007), dass infizierte Lymphozyten tatsächlich das Knochenmark infiltrieren, ergibt sich ein starkes Verdachtsmoment bezüglich einer möglichen Route *in vivo*, über die die Infektion ins Knochenmark gelangen könnte. Nun sind im Tiermodell weder HS/PC noch Knochenmarksstromazellen auf eine Infektion hin analysiert worden, so dass diese Möglichkeit erst noch in neuen Experimenten bewiesen werden müsste. Auch die bereits erwähnte Kohortenstudie (Sonoda et al, 2002) konnte zwar die Präsenz viraler RNA in humanen Knochenmarksaspiraten belegen, jedoch wurde nicht differentiell analysiert, welche Zellpopulationen infiziert waren.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass wildtypisches MV potentiell das Knochenmark infiltrieren und dort auch Knochenmarkszellen infizieren oder zumindest in Kontakt zu diesen kommen könnte, wurde untersucht, ob die Exposition von HS/PC zu wildtypischem MV einen Effekt auf ihr Differenzierungs- bzw. Expansionspotential hat. Hierbei geht es nicht nur um Effekte, die durch die Infektion verursacht werden, sondern auch um für MV nicht untypische kontaktinduzierte Effekte. Es wurde für primäre T-Zellen bereits beschrieben, dass *in vitro* allein der Kontakt viraler Glykoproteine zur Inhibition der Proliferation führt, die durch die Stimulation durch antigenpräsentierende Zellen initiiert wird (Abt et al, 2009). Darüber hinaus ist die Expression des Rezeptors CD150 nicht zwingend erforderlich. Einen ähnlichen Proliferationsarrest kann der Kontakt zu MV auch bei der T-Zelllinie Jurkat, die CD150⁻ ist, verursachen (Avota et al, 2001). HS/PC sind jedoch in ihrem Proliferations- bzw Differenzierungspotential *in vitro* durch den vorherigen Kontakt zu MV nicht gestört. Im Gegensatz beispielsweise zu HIV, das nicht nur *in vivo*

Knochenmarksuppression verursacht (Carter et al, 2010), sondern auch *in vitro* die Kolonienbildung von gesunden HPC nach Exposition inhibiert (Steinberg et al, 1991), konnten im CFA keine Unterschiede zwischen MOCK- bzw MV-exponierten HS/PC beobachtet werden und zwar weder bezüglich der Anzahl noch der Art der gebildeten Kolonien. Es wurden trotz MV-Exposition sowohl erythroide als auch myeloide Kolonien gebildet. Insoweit decken sich die Resultate der *in vitro*-Experimente mit den für den dualtrophen Stamm MV-JW publizierten Ergebnissen (Manchester et al, 2002). Auch in dem Fall konnte kein Effekt auf die Expansion bzw. Differenzierung von HS/PC nach MV-Kontakt beobachtet werden. Auch ein rezeptorabhängiger Effekt konnte *in vitro* ausgeschlossen werden. Betrachtet man isolierte CD150⁺-HPC im CFA, konnten auch hier keine Unterschiede im Kolonienwachstum zwischen MOCK- und MV-exponierten HPC detektiert werden. Da auch bei CD150⁻-HS/PC die MV-Exposition zu keinem unterschiedlichen Kolonienwachstum führte, kann ausgeschlossen werden, dass eine der beiden Fraktionen durch MV-Kontakt beeinflusst wurde, was im CFA mit unfraktionierten HS/PC vielleicht nicht hätte detektiert werden können. Besonders ein Effekt auf die CD150⁺-Fraktion, die ca. 5 % der Gesamtpopulation ausmachte, wäre im CFA mit unfraktionierten HS/PC nicht aufgefallen, da hier selbst die Schwankungen in der Kolonienzahl innerhalb eines Experiments zwischen den drei Ansätzen teilweise größer als 5 % sein konnten.

Das *in vitro*-Experiment CFA stellt zwar ein nützliches Mittel dar, um das Differenzierungs- und Expansionspotential einer HS/PC-Population zu analysieren, weist jedoch auch Schwächen auf, wenn es darum geht, Effekte auf die Hämatopoese zu untersuchen. Die HS/PC werden im CFA unabhängig vom Kontakt mit Stromazellen mit rekombinanten, löslichen Zytokinen aus dem Medium versorgt und so wird die Komplexität der Interaktion mit der Nische nur unzulänglich wiedergespiegelt. Darüber hinaus kann im CFA auch nur die Differenzierung in Zellen der myeloiden bzw. erythroiden Linie analysiert werden. Mögliche Effekte auf die lymphoide Entwicklung der HS/PC werden hierbei nicht sichtbar. Die Xenotransplantation bietet hier die Möglichkeit, Effekte auf die humane Hämatopoese *in vivo* zu untersuchen. Dabei werden humane HS/PC in NOD/SCID-IL2R $\gamma^{-/-}$ -Mäuse transplantiert, deren eigene HS/PC durch eine vorangegangene Bestrahlung mit einer Intensität von 2,5 Gy zerstört wurden. Humane HS/PC sind in

der Lage, in diesen Mäusen die humane Hämatopoese zu etablieren und zu Zellen aller Linien zu differenzieren. Die humanen HS/PC finden im murinen Knochenmarkstroma ihre Nische, in der sie sich wie im humanen System einnisten können. Diese Vorteile gegenüber den *in vitro*-Experimenten machte die Xenotransplantation in NOD/SCID-IL2R γ ^{-/-}-Mäusen zum Goldstandard der HS/PC-Forschung. Neben diesen Vorteilen ist eine Xenotransplantation in Mäuse im Zusammenhang mit dieser Studie besonders interessant, da MV nicht in der Lage ist, murine Zellen zu infizieren und in diesen zu replizieren. MV-induzierte Effekte auf die Hämatopoese, die man im Transplantationsexperiment beobachtet, sind demzufolge auf die Interaktion des Virus mit den transplantierten HS/PC zurückzuführen. Eine Virustransmission von humanen HS/PC auf murine Knochenmarkstromazellen und dadurch bedingte Störungen der Hämatopoese sind folglich ausgeschlossen. Die Langzeitrekonstitution des murinen hämatopoetischen Kompartiments wird durch MV-Exposition der HS/PC nicht beeinträchtigt. Die unmittelbar vor der Transplantation für 1 h MV-exponierten HS/PC zeigten bezüglich der Rekonstitution nach 13 Wochen das gleiche Potential wie MOCK-exponierte HS/PC. Die Hämatopoese wurde in beiden Fällen vollständig wiederhergestellt. Die MV-Exposition wirkt sich auch nicht auf die Differenzierung in die myeloide bzw. lymphoide Linie aus. Die nach 13 Wochen nachgewiesene Rekonstitution geht vor allem von hämatopoetischen Stammzellen aus, die sich in der transplantierten HS/PC-Population befanden. Es konnte gezeigt werden, dass nach der Transplantation von HSC innerhalb der ersten 2 Wochen noch keine Expansion nachweisbar ist, sondern erst nach 4 Wochen. Im Gegensatz dazu expandieren transplantierte HPC bereits nach 4 Tagen und es sind ausschließlich sie, die in den ersten beiden Wochen zur Rekonstitution beitragen. Nach 2 Wochen beginnt der apoptotische Zerfall dieser Zellen, sodass in Mäusen, denen nur HPC injiziert wurden, nach 4 Wochen kaum noch humane Zellen nachweisbar sind (Kerre et al, 2001). Daraus lässt sich schließen, dass die MV-Exposition keinen negativen Effekt auf HSC hat oder dass es ein transienter Effekt ist, der hier nicht zum Tragen kommt, da die HSC erst nach 2 Wochen zu expandieren beginnen. Da ein Effekt auf die transplantierten HPC nach 13 Wochen nicht mehr detektierbar ist, wurde die Rekonstitution der Mäuse 7 Tage nach der Transplantation untersucht. Der dramatische Verlust des Rekonstitutionspotentials der HPC nach MV-Exposition in dieser Zeit spricht für einen inhibierenden Effekt, der

nicht infektiösbedingt ist. Die durchschnittliche Infektionsrate von 4.02 % kann nicht als Erklärung für eine im Schnitt ca. 67 % geringere Rekonstitution nach 7 Tagen dienen. Des Weiteren ist eine selektive Inhibition der CD150⁺-HPC aus den gleichen Gründen ausgeschlossen. Ihr Anteil an der HS/PC-Population lag im Schnitt bei 5,53 %. Wie bereits diskutiert ist das MV jedoch dafür bekannt, dass es einen Proliferationsarrest sowohl infektiös- als auch CD150-unabhängig verursachen kann. Der Kontakt mit der Virushülle bzw. dem Glykoproteinkomplex kann dabei bereits ausreichen. Da dieser Expansionsarrest nur *in vivo*, aber nicht *in vitro* detektierbar ist, liegt die Vermutung nahe, dass die Interaktion der HS/PC mit ihrer Nische gestört ist. Da die murinen Knochenmarksstromazellen nicht durch MV beeinflusst werden, muss die Störung auf Seiten der HS/PC gesucht werden. Eine Möglichkeit, diese Interaktion zu stören, wäre eine inhibierte bzw. fehlgesteuerte Migration der HPC *in vivo*. In die Schwanzvene injizierte HS/PC migrieren chemotaktisch gesteuert in verschiedene lymphatische Organe, unter anderem in die Milz und in das Knochenmark. Erst nach der Ankunft beginnen sie mit der Expansion und Rekonstitution des hämatopoetischen Kompartiments. Die Migration zum Knochenmark ist während der Embryonalentwicklung von physiologischer Bedeutung. Bei allen Vertebraten verlagert sich der Ort der Hämatopoese während der Genese mehrmals, was eine Migration der HSC voraussetzt (Coskun & Hirschi, 2010; Peault & Tavian, 2003; Tavian et al, 2010). Sowohl bei Mäusen als auch beim Menschen bildet die fötale Leber die vorletzte Station für die HSC während der Embryonalentwicklung. Nach Entwicklung des Knochenmarks migrieren die HSC aus der fötalen Leber in dieses ein (bei Mäusen zusätzlich auch noch in die Milz (Askmyr et al, 2009)), wo sie letztlich ihre Nische vorfinden, die sich auch im adulten Organismus nicht mehr ändert (Askmyr et al, 2009; Coskun & Hirschi, 2010; Peault & Tavian, 2003). Diese auch als *homing* bezeichnete Migration ähnelt dabei der Leukozytenmigration ins inflammatorische Gewebe bzw. deren *homing* in die Lymphknoten. HS/PC migrieren über den Blutstrom ins Knochenmark. An Knochenmarksblutgefäßen treten sie über P- und E-Selektine mit Endothelzellen in Interaktion. Dadurch kommt es zur, für T-Zellen ebenfalls beschriebenen, rollenden Bewegung auf der Gefäßwand, die letztlich zur Adhäsion und zum Arrest führt. Daraufhin folgt die Transmigration durch die Gefäßwand und das Einnisten ins Knochenmark. Vergleichbar mit der T-Zellmigration sind die adhäsiven Schritte der

HS/PC-Migration hauptsächlich von dem Chemokin CXCL12 und dem dazugehörigen Rezeptor CXCR4 gesteuert (Moll & Ransohoff, 2010). Für T-Zellen wurde eine MV-induzierte Störung der Polarisationsfähigkeit und der Migration nach CXCL12-Stimulation beschrieben (Abt et al, 2009), sodass es nahe lag, diesen Sachverhalt für das *homing* der HS/PC nach Transplantation zu überprüfen, besonders da diese Inhibition für ruhende T-Zellen beschrieben wurde, die keine CD150-Oberflächenexpression vorweisen und somit der Migrationsarrest sowohl infektions- als auch CD150-unabhängig durch MV verursacht wird. Ein solcher Effekt der MV-Exposition tritt bei HS/PC jedoch nicht auf. Es wird weder das HS/PC-*homing* in die Milz noch in das Knochenmark beeinflusst, sodass eine geringere Anzahl an ankommenden HPC als Begründung für die gestörte Kurzzeitrekstitution der bestrahlten Mäuse ausgeschlossen werden kann. Weiterhin gab dieses Experiment darüber Aufschluss, dass auch 40 h nach der MV-Exposition und Transplantation kein negativer Effekt auf die Viabilität der Zellen auftrat. MV-induzierter Zelltod kann, besonders unter Berücksichtigung der Viabilitätsanalysen 6 Tage nach Infektion *in vitro*, folglich ebenfalls als Ursache ausgeschlossen werden. Da, wie bereits dargelegt, die Ursache für die Inhibition auf Seiten der HS/PC vorzufinden sein sollte, liegt es nahe zu vermuten, dass die vorangegangene MV-Exposition die Reaktion auf ein Proliferationssignal inhibiert. Da ein solcher Effekt *in vitro* nicht nachweisbar war, kann spekuliert werden, dass es sich hierbei um ein durch den direkten Zell-Zell-Kontakt zwischen Stromazellen und HS/PC übertragenes Signal handelt. Die Aufklärung des genauen Mechanismus, der der inhibierten HPC-Expansion zu Grunde liegt, bleibt Grundlage zukünftiger Forschung.

Die beobachtete transiente und generelle Inhibition der Hämatopoese in Xenotransplantationsexperimenten nach vorangegangener MV-Exposition ist ein interessantes Indiz dafür, dass eine Knochenmarkssuppression mit zur MV-induzierten generellen und transienten Immunsuppression bzw. Leukopenie beiträgt. Genauere Erkenntnisse können in diesem Fall jedoch nur weitere Experimente im Tiermodell mit Rhesusaffen erbringen, da in ihnen die Pathogenese inklusive der Kennzeichen eine MV-induzierten Immunsuppression ähnlich wie beim Menschen abläuft (Auwaerter et al, 1999).

6 Zusammenfassung

Eine Suppression der Knochenmarkszellen, und damit der Hämatopoese, gilt bei Viruserkrankungen wie der HIV-Infektion und den Ringelröteln als eine der Ursachen für eine Leukopenie bzw. Anämie. Die MV-induzierte Immunsuppression ist unter anderem durch eine Leukopenie gekennzeichnet und so wurde in der vorliegenden Studie die Frage nach den Auswirkungen einer Interaktion des MV mit Knochenmarkszellen adressiert. Da der MV-Rezeptor CD150 im Rahmen des SLAM-codes als muriner hämatopoetischer Stammzell (HSC)-Marker identifiziert wurde, galt es zunächst, die Anwendbarkeit dieses Codes auf humane hämatopoetische Stamm-/Vorläuferzellen (HS/PC) zu untersuchen. Humane HSC, multipotente und oligopotente hämatopoetische Vorläuferzellen (HPC) können, im Gegensatz zu murinen, nicht anhand des SLAM-codes unterschieden werden. Während CD244 auf allen HS/PC exprimiert wird, markieren CD150 und CD48 eher humane HPC als HSC. Trotz vorhandener CD150⁺-HPC beschränkt sich die Infektion mit wildtypischen MV nicht auf diese Subpopulation, sondern erfolgt, wie bei CD150⁻ Stromazellen, unabhängig von diesem Rezeptor. Die Infektionsrate ist in beiden Zelltypen niedrig und führt *in vitro* zu keiner Beeinträchtigung der Vitalität. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die MV-Exposition von HS/PC *in vitro* weder deren Proliferation noch die Fähigkeit zur Koloniebildung stört. Im Gegensatz dazu infiziert das dualtrope, attenuierte MV beide Zelltypen sehr effizient und im Fall der Stromazellen auch lytisch. Dass sich eine MV-Infektion in Kokulturen von HS/PC mit Stromazellen vom jeweils einen auf den anderen Zelltypen überträgt, könnte als möglicher Mechanismus zur Ausbreitung und Etablierung einer Infektion im Knochenmark angesehen werden. Einen Zugang zu diesem Kompartiment erlangt das MV, wie Tiermodellstudien zeigen, über infizierte Lymphozyten, die dieses Organ infiltrieren. Die demonstrierte und äußerst effiziente Übertragung des MV von Lymphozyten auf HS/PC und Stromazellen *in vitro* liefert hierbei ein Indiz für eine mögliche Route der Infektion *in vivo*. Obwohl *in vitro* keine Inhibition der Expansion von HS/PC beobachtet wurde, stört eine vorangegangene MV-Exposition die Kurzzeitrekonstitution bestrahlter NOD/SCID-Mäuse massiv. Diese Inhibition der Hämatopoese ist jedoch transient und hat keine Auswirkungen auf die Langzeitrekonstitution. Da weder die Migration der transplantierten HS/PC zum Knochenmark gestört ist noch die Knochenmarkszellen der Maus permissiv für eine

MV-Infektion sind, ist die beobachtete Inhibition auf einen direkten Einfluss der MV-Exposition auf die HS/PC zurückzuführen.

Zusammengefasst unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit die Hypothese, dass eine mögliche Knochenmarkssuppression durch MV einen Beitrag zur Leukopenie leistet.

7 Summary

Bone marrow suppression, and thereby suppression of hematopoiesis, is described for several viral diseases, such as HIV-infection and fifth disease (parvovirus B19), to contribute to leukopenia and anemia. MV-induced immunosuppression is marked by leukopenia so that we addressed the question whether the interaction of MV with bone marrow cells would have any consequences. The MV-Rezeptor CD150 has been identified, as part of the SLAM-code, to mark murine hematopoietic stem cells (HSC) and the present study firstly analyzed if this code also applied to human hematopoietic stem/progenitor cells (HS/PC). In contrast to their murine counterparts, human HSC, multipotent and oligopotent hematopoietic progenitor cells (HPC) cannot be distinguished based on the SLAM-code. While CD244 is expressed by all HS/PC, CD150 and CD48 rather mark human HPC than HSC. Though CD150⁺-HPC exist, the infection by wild type MV is not restricted to this subpopulation but occurs, as for the CD150⁻ stroma cells as well, CD150-independently. The infection rate in both cell types is low and infection does not affect viability of these cells *in vitro*. Furthermore it was shown that MV-exposure of HS/PC neither affects their proliferation nor their ability to form colonies *in vitro*. In contrast to that, dualtropic, attenuated MV infects both cell types very efficiently and leads to lytic destruction of stroma cells. MV is mutually transmitted in co-cultures of HS/PC and stroma cells from one cell type to the other, and this might be a possible way for the virus to spread and to establish an infection within the bone marrow. As proven by studies in animal models, the virus gets access to this compartment by infected lymphocytes which home to this organ. The highly efficient transmission of MV from lymphocytes to both, HS/PC and stroma cells *in vitro*, may display a possible route of infection *in vivo*. Although MV-exposure does not affect HS/PC-expansion *in vitro*, it massively inhibits short term reconstitution of irradiated NOD/SCID-mice. However, this inhibition of hematopoiesis remains transient and has no consequences for long term reconstitution. Since transplanted HS/PC home normally and murine bone marrow cells do not support MV-replication, the effects observed on hematopoiesis can only be explained by a direct influence of MV-exposure to HS/PC.

Altogether, the results of this study support the hypothesis that MV induced bone marrow suppression may contribute to leukopenia.

8 Literaturverzeichnis

- Abkowitz JL, Catlin SN, McCallie MT, Gutter P** (2002) Evidence that the number of hematopoietic stem cells per animal is conserved in mammals. *Blood* 100: 2665-2667
- Abt M, Gassert E, Schneider-Schaulies S** (2009) Measles virus modulates chemokine release and chemotactic responses of dendritic cells. *J Gen Virol* 90: 909-914
- Ailles LE, Gerhard B, Kawagoe H, Hogge DE** (1999) Growth characteristics of acute myelogenous leukemia progenitors that initiate malignant hematopoiesis in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Blood* 94: 1761-1772
- Allen IV, McQuaid S, McMahon J, Kirk J, McConnell R** (1996) The significance of measles virus antigen and genome distribution in the CNS in SSPE for mechanisms of viral spread and demyelination. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 471-480
- Andres O, Obojes K, Kim KS, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J** (2003) CD46- and CD150-independent endothelial cell infection with wild-type measles viruses. *J Gen Virol* 84: 1189-1197
- Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID** (1986) Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors. *Blood* 67: 842- 845
- Arai F, Suda T** (2007) Regulation of hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. *Adv Exp Med Biol* 602: 61-67
- Askmyr M, Quach J, Purton LE** (2011) Effects of the bone marrow microenvironment on hematopoietic malignancy. *Bone* 48: 115-120
- Askmyr M, Sims NA, Martin TJ, Purton LE** (2009) What is the true nature of the osteoblastic hematopoietic stem cell niche? *Trends Endocrinol Metab* 20: 303-309

- Auwaerter PG, Rota PA, Elkins WR, Adams RJ, DeLozier T, Shi Y, Bellini WJ, Murphy BR, Griffin DE** (1999) Measles virus infection in rhesus macaques: altered immune responses and comparison of the virulence of six different virus strains. *J Infect Dis* 180: 950-958
- Avota E, Avots A, Niewiesk S, Kane LP, Bommhardt U, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S** (2001) Disruption of Akt kinase activation is important for immunosuppression induced by measles virus. *Nat Med* 7: 725-731
- Avota E, Gassert E, Schneider-Schaulies S** (2010) Measles virus-induced immunosuppression: from effectors to mechanisms. *Med Microbiol Immunol* 199: 227-237
- Avota E, Harms H, Schneider-Schaulies S** (2006) Measles virus induces expression of SIP110, a constitutively membrane clustered lipid phosphatase, which inhibits T cell proliferation. *Cell Microbiol* 8: 1826- 1839
- Avota E, Muller N, Klett M, Schneider-Schaulies S** (2004) Measles virus interacts with and alters signal transduction in T-cell lipid rafts. *J Virol* 78: 9552-9559
- Baczko K, Liebert UG, Billeter M, Cattaneo R, Budka H, ter Meulen V** (1986) Expression of defective measles virus genes in brain tissues of patients with subacute sclerosing panencephalitis. *J Virol* 59: 472-478
- Banerjee AK** (1987) The transcription complex of vesicular stomatitis virus. *Cell* 48: 363-364
- Bellini WJ, Englund G, Rozenblatt S, Arnheiter H, Richardson CD** (1985) Measles virus P gene codes for two proteins. *J Virol* 53: 908-919
- Bellini WJ, Rota JS, Rota PA** (1994) Virology of measles virus. *J Infect Dis* 170 Suppl 1: S15-23
- Black FL** (1965) Measles: its spread from cell to cell and person to person. *Can J Public Health* 56: 517-520

- Blumberg BM, Kolakofsky D** (1981) Intracellular vesicular stomatitis virus leader RNAs are found in nucleocapsid structures. *J Virol* 40: 568-576
- Bolt G, Pedersen IR, Blixenkron-Moller M** (1999) Processing of N-linked oligosaccharides on the measles virus glycoproteins: importance for antigenicity and for production of infectious virus particles. *Virus Res* 61: 43-51
- Bonnet D** (2003) Hematopoietic stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69: 219-229
- Bonnet D, Dick JE** (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3: 730-737
- Boxall SA, Cook GP, Pearce D, Bonnet D, El-Sherbiny YM, Blundell MP, Howe SJ, Leek JP, Markham AF, de Wynter EA** (2009) Haematopoietic repopulating activity in human cord blood CD133+ quiescent cells. *Bone Marrow Transplant* 43: 627-635
- Calain P, Roux L** (1993) The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *J Virol* 67: 4822-4830
- Carlesso N, Cardoso AA** (2010) Stem cell regulatory niches and their role in normal and malignant hematopoiesis. *Curr Opin Hematol* 17: 281-286
- Carter CC, Onafuwa-Nuga A, McNamara LA, Riddell Jt, Bixby D, Savona MR, Collins KL** (2010) HIV-1 infects multipotent progenitor cells causing cell death and establishing latent cellular reservoirs. *Nat Med* 16: 446-451
- Cattaneo R, Kaelin K, Baczko K, Billeter MA** (1989) Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. *Cell* 56: 759-764
- Cattaneo R, Rebmann G, Baczko K, ter Meulen V, Billeter MA** (1987a) Altered ratios of measles virus transcripts in diseased human brains. *Virology* 160: 523-526

- Cattaneo R, Rebmann G, Schmid A, Baczko K, ter Meulen V, Billeter MA** (1987b) Altered transcription of a defective measles virus genome derived from a diseased human brain. *Embo J* 6: 681-688
- Cattaneo R, Schmid A, Billeter MA, Sheppard RD, Udem SA** (1988) Multiple viral mutations rather than host factors cause defective measles virus gene expression in a subacute sclerosing panencephalitis cell line. *J Virol* 62: 1388-1397
- Cevik B, Holmes DE, Vrotsos E, Feller JA, Smallwood S, Moyer SA** (2004) The phosphoprotein (P) and L binding sites reside in the N-terminus of the L subunit of the measles virus RNA polymerase. *Virology* 327: 297-306
- Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH** (1984) Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 133: 157-165
- Clements CJ, Cutts FT** (1995) The epidemiology of measles: thirty years of vaccination. *Curr Top Microbiol Immunol* 191: 13-33
- Coskun S, Hirschi KK** (2010) Establishment and regulation of the HSC niche: Roles of osteoblastic and vascular compartments. *Birth Defects Res C Embryo Today* 90: 229-242
- Crowley JC, Dowling PC, Menonna J, Silverman JI, Schuback D, Cook SD, Blumberg BM** (1988) Sequence variability and function of measles virus 3' and 5' ends and intercistronic regions. *Virology* 164: 498-506
- Cruz CD, Palosaari H, Parisien JP, Devaux P, Cattaneo R, Ouchi T, Horvath CM** (2006) Measles virus V protein inhibits p53 family member p73. *J Virol* 80: 5644-5650
- Dar A, Kollet O, Lapidot T** (2006) Mutual, reciprocal SDF-1/CXCR4 interactions between hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in NOD/SCID chimeric mice. *Exp Hematol* 34: 967-975

- de Swart RL, Ludlow M, de Witte L, Yanagi Y, van Amerongen G, McQuaid S, Yuksel S, Geijtenbeek TB, Duprex WP, Osterhaus AD** (2007) Predominant infection of CD150+ lymphocytes and dendritic cells during measles virus infection of macaques. *PLoS Pathog* 3: e178
- de Vries RD, Lemon K, Ludlow M, McQuaid S, Yuksel S, van Amerongen G, Rennick LJ, Rima BK, Osterhaus AD, de Swart RL, Duprex WP** (2010) In vivo tropism of attenuated and pathogenic measles virus expressing green fluorescent protein in macaques. *J Virol* 84: 4714-4724
- de Wynter EA, Buck D, Hart C, Heywood R, Coutinho LH, Clayton A, Rafferty JA, Burt D, Guenechea G, Bueren JA, Gagen D, Fairbairn LJ, Lord BI, Testa NG** (1998) CD34+AC133+ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors. *Stem Cells* 16: 387-396
- Devaux P, Loveland B, Christiansen D, Milland J, Gerlier D** (1996) Interactions between the ectodomains of haemagglutinin and CD46 as a primary step in measles virus entry. *J Gen Virol* 77 (Pt 7): 1477-1481
- Devaux P, von Messling V, Songsungthong W, Springfield C, Cattaneo R** (2007) Tyrosine 110 in the measles virus phosphoprotein is required to block STAT1 phosphorylation. *Virology* 360: 72-83
- Dingli D, Pacheco JM** (2010) Modeling the architecture and dynamics of hematopoiesis. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2: 235-244
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E** (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315-317
- Duprex WP, Collins FM, Rima BK** (2002) Modulating the function of the measles virus RNA-dependent RNA polymerase by insertion of green fluorescent protein into the open reading frame. *J Virol* 76: 7322-7328

- Duprex WP, McQuaid S, Hangartner L, Billeter MA, Rima BK** (1999) Observation of measles virus cell-to-cell spread in astrocytoma cells by using a green fluorescent protein-expressing recombinant virus. *J Virol* 73: 9568-9575
- Fontana JM, Bankamp B, Bellini WJ, Rota PA** (2008) Regulation of interferon signaling by the C and V proteins from attenuated and wild-type strains of measles virus. *Virology* 374: 71-81
- Furuse Y, Suzuki A, Oshitani H** (2010) Origin of measles virus: divergence from rinderpest virus between the 11th and 12th centuries. *Viol J* 7: 52
- Gombart AF, Hirano A, Wong TC** (1995) Nucleoprotein phosphorylated on both serine and threonine is preferentially assembled into the nucleocapsids of measles virus. *Virus Res* 37: 63-73
- Gordon MY, Lewis JL, Marley SB** (2002) Of mice and men...and elephants. *Blood* 100: 4679-4680
- Greenberger JS** (1991) The hematopoietic microenvironment. *Crit Rev Oncol Hematol* 11: 65-84
- Griffin DE, Pan CH, Moss WJ** (2008) Measles vaccines. *Front Biosci* 13: 1352-1370
- Griffin DE, Ward BJ** (1993) Differential CD4 T cell activation in measles. *J Infect Dis* 168: 275-281
- Gutierrez J, Issacson RS, Koppel BS** (2010) Subacute sclerosing panencephalitis: an update. *Dev Med Child Neurol* 52: 901-907
- Hashiguchi T, Ose T, Kubota M, Maita N, Kamishikiryo J, Maenaka K, Yanagi Y** (2011) Structure of the measles virus hemagglutinin bound to its cellular receptor SLAM. *Nat Struct Mol Biol* 18: 135-141
- Hashimoto K, Ono N, Tatsuo H, Minagawa H, Takeda M, Takeuchi K, Yanagi Y** (2002) SLAM (CD150)-independent measles virus entry as revealed by recombinant virus expressing green fluorescent protein. *J Virol* 76: 6743- 6749

- Herndon RM, Rubinstein LJ** (1968) Light and electron microscopy observations on the development of viral particles in the inclusions of Dawson's encephalitis (subacute sclerosing panencephalitis). *Neurology* 18: 8-20
- Hoffman SJ, Polack FP, Hauer DA, Griffin DE** (2003) Measles virus infection of rhesus macaques affects neutrophil expression of IL-12 and IL-10. *Viral Immunol* 16: 369-379
- Hölscher G** (2009). Aktuelle Daten zum Durchimpfungsgrad gegen Masern aus der Schuleingangsuntersuchung zum Schuljahr 2007/08 in Bayern. 1. *Nationale Impfkonzferenz*, Mainz, Deutschland.
- Horikami SM, Moyer SA** (1995) Structure, transcription, and replication of measles virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 191: 35-50
- Inoue T, Kira R, Nakao F, Ihara K, Bassuny WM, Kusuhara K, Nihei K, Takeshita K, Hara T** (2002) Contribution of the interleukin 4 gene to susceptibility to subacute sclerosing panencephalitis. *Arch Neurol* 59: 822-827
- Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B, Yoshida S, Miyamoto T, Yoshimoto G, Watanabe T, Akashi K, Shultz LD, Harada M** (2005) Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice. *Blood* 106: 1565-1573
- Ishizaki Y, Takemoto M, Kira R, Kusuhara K, Torisu H, Sakai Y, Sanefuji M, Yukaya N, Hara T** (2008) Association of toll-like receptor 3 gene polymorphism with subacute sclerosing panencephalitis. *J Neurovirol* 14: 486-491
- Kalter SS, Heberling RL, Cooke AW, Barry JD, Tian PY, Northam WJ** (1997) Viral infections of nonhuman primates. *Lab Anim Sci* 47: 461-467
- Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K** (2006) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24: 1294-1301

- Kerre TC, De Smet G, De Smedt M, Offner F, De Bosscher J, Plum J, Vandekerckhove B** (2001) Both CD34+38+ and CD34+38- cells home specifically to the bone marrow of NOD/LtSZ scid/scid mice but show different kinetics in expansion. *J Immunol* 167: 3692-3698
- Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Terhorst C, Morrison SJ** (2005) SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 121: 1109-1121
- Kim YJ, Kim SY, Kim YY, Kim JW, Lee JH, Han K, Lee W** (2002) Quantities of receptor molecules for colony stimulating factors on leukocytes in measles. *Yonsei Med J* 43: 43-47
- Kimura A, Tosaka K, Nakao T** (1975) An immunofluorescent and electron microscopic study of measles skin eruptions. *Tohoku J Exp Med* 117: 245-256
- Lamb** (1996) *Paramyxoviridae, the viruses and their replication*. in: Fields Virology, 1177-1204.
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE** (1994) A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367: 645-648
- Larochelle A, Savona M, Wiggins M, Anderson S, Ichwan B, Keyvanfar K, Morrison SJ, Dunbar CE** (2011) Human and rhesus macaque hematopoietic stem cells cannot be purified based only on SLAM family markers. *Blood* 117: 1550-1554
- Lawrence DM, Patterson CE, Gales TL, D'Orazio JL, Vaughn MM, Rall GF** (2000) Measles virus spread between neurons requires cell contact but not CD46 expression, syncytium formation, or extracellular virus production. *J Virol* 74: 1908-1918
- Lemon K, de Vries RD, Mesman AW, McQuaid S, van Amerongen G, Yuksel S, Ludlow M, Rennick LJ, Kuiken T, Rima BK, Geijtenbeek TB, Osterhaus AD, Duprex WP, de Swart RL** (2011) Early target cells of measles virus after aerosol infection of non-human primates. *PLoS Pathog* 7: e1001263

- Liston P, Briedis DJ** (1995) Ribosomal frameshifting during translation of measles virus P protein mRNA is capable of directing synthesis of a unique protein. *J Virol* 69: 6742-6750
- Liston P, DiFlumeri C, Briedis DJ** (1995) Protein interactions entered into by the measles virus P, V, and C proteins. *Virus Res* 38: 241-259
- Liszewski MK, Post TW, Atkinson JP** (1991) Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu Rev Immunol* 9: 431-455
- Manchester M, Eto DS, Valsamakis A, Liton PB, Fernandez-Munoz R, Rota PA, Bellini WJ, Forthal DN, Oldstone MB** (2000) Clinical isolates of measles virus use CD46 as a cellular receptor. *J Virol* 74: 3967-3974
- Manchester M, Smith KA, Eto DS, Perkin HB, Torbett BE** (2002) Targeting and hematopoietic suppression of human CD34+ cells by measles virus. *J Virol* 76: 6636-6642
- Manie SN, de Breyne S, Vincent S, Gerlier D** (2000) Measles virus structural components are enriched into lipid raft microdomains: a potential cellular location for virus assembly. *J Virol* 74: 305-311
- Matthews BG, Afzal MA, Minor PD, Bava U, Callon KE, Pitto RP, Cundy T, Cornish J, Reid IR, Naot D** (2008) Failure to detect measles virus ribonucleic acid in bone cells from patients with Paget's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 1398-1401
- McCarthy KF** (2003) Marrow frequency of rat long-term repopulating cells: evidence that marrow hematopoietic stem cell concentration may be inversely proportional to species body weight. *Blood* 101: 3431-3435
- McChesney MB, Miller CJ, Rota PA, Zhu YD, Antipa L, Lerche NW, Ahmed R, Bellini WJ** (1997) Experimental measles. I. Pathogenesis in the normal and the immunized host. *Virology* 233: 74-84
- McNeill WH** (1976) *Plagues and People*, Garden City, NY Anchor Press/Doubleday.

- McQuaid S, Cosby SL** (2002) An immunohistochemical study of the distribution of the measles virus receptors, CD46 and SLAM, in normal human tissues and subacute sclerosing panencephalitis. *Lab Invest* 82: 403-409
- Meggetto F, Cesarman E, Mourey L, Massip P, Delsol G, Brousset P** (2001) Detection and characterization of human herpesvirus-8-infected cells in bone marrow biopsies of human immunodeficiency virus-positive patients. *Hum Pathol* 32: 288-291
- Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW** (1997) A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 90: 5013-5021
- Moll M, Klenk HD, Maisner A** (2002) Importance of the cytoplasmic tails of the measles virus glycoproteins for fusogenic activity and the generation of recombinant measles viruses. *J Virol* 76: 7174-7186
- Moll NM, Ransohoff RM** (2010) CXCL12 and CXCR4 in bone marrow physiology. *Expert Rev Hematol* 3: 315-322
- Morgan EM, Rapp F (1977) Measles virus and its associated diseases. *Bacteriol Rev* 41: 636-666
- Navaratnarajah CK, Leonard VH, Cattaneo R** (2009) Measles virus glycoprotein complex assembly, receptor attachment, and cell entry. *Curr Top Microbiol Immunol* 329: 59-76
- Novelli EM, Ramirez M, Civin CI** (1998) Biology of CD34+CD38- cells in lymphohematopoiesis. *Leuk Lymphoma* 31: 285-293
- Okada H, Sato TA, Katayama A, Higuchi K, Shichijo K, Tsuchiya T, Takayama N, Takeuchi Y, Abe T, Okabe N, Tashiro M** (2001) Comparative analysis of host responses related to immunosuppression between measles patients and vaccine recipients with live attenuated measles vaccines. *Arch Virol* 146: 859-874

- Peault B, Tavian M** (2003) Hematopoietic stem cell emergence in the human embryo and fetus. *Ann N Y Acad Sci* 996: 132-140
- Pipo-Deveza JR, Kusuhara K, Silao CL, Lukban MB, Salonga AM, Sanchez BC, Kira R, Takemoto M, Torisu H, Hara T** (2006) Analysis of MxA, IL-4, and IRF-1 genes in Filipino patients with subacute sclerosing panencephalitis. *Neuropediatrics* 37: 222-228
- Plempner RK, Hammond AL, Cattaneo R** (2000) Characterization of a region of the measles virus hemagglutinin sufficient for its dimerization. *J Virol* 74: 6485-6493
- Pohl C, Duprex WP, Krohne G, Rima BK, Schneider-Schaulies S** (2007) Measles virus M and F proteins associate with detergent-resistant membrane fractions and promote formation of virus-like particles. *J Gen Virol* 88: 1243-1250
- Purton LE, Scadden DT** (2008) The hematopoietic stem cell niche. In *StemBook*. Cambridge (MA)
- Retief F, Cilliers L** (2010) Measles in antiquity and the Middle Ages. *S Afr Med J* 100: 216-217
- Reuter D, Schneider-Schaulies J** (2010) Measles virus infection of the CNS: human disease, animal models, and approaches to therapy. *Med Microbiol Immunol* 199: 261-271
- Rezaee F, Gibson LF, Piktel D, Othumpangat S, Piedimonte G** (2010) Respiratory Syncytial Virus Infection in Human Bone Marrow Stromal Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*
- Riley EC, Murphy G, Riley RL** (1978) Airborne spread of measles in a suburban elementary school. *Am J Epidemiol* 107: 421-432
- Rima BK, Duprex WP** (2005) Molecular mechanisms of measles virus persistence. *Virus Res* 111: 132-147

- Rima BK, Earle JA, Yeo RP, Herlihy L, Baczko K, ter Meulen V, Carabana J, Caballero M, Celma ML, Fernandez-Munoz R** (1995) Temporal and geographical distribution of measles virus genotypes. *J Gen Virol* 76 (Pt 5): 1173-1180
- Roncarolo MG, Gregori S, Lucarelli B, Ciceri F, Bacchetta R** (2011) Clinical tolerance in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Immunol Rev* 241: 145-163
- Runkler N, Pohl C, Schneider-Schaulies S, Klenk HD, Maisner A** (2007) Measles virus nucleocapsid transport to the plasma membrane requires stable expression and surface accumulation of the viral matrix protein. *Cell Microbiol* 9: 1203-1214
- Ryon JJ, Moss WJ, Monze M, Griffin DE** (2002) Functional and phenotypic changes in circulating lymphocytes from hospitalized zambian children with measles. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 994-1003
- Sakaguchi M, Yoshikawa Y, Yamanouchi K, Sata T, Nagashima K, Takeda K** (1986) Growth of measles virus in epithelial and lymphoid tissues of cynomolgus monkeys. *Microbiol Immunol* 30: 1067-1073
- Salditt A, Koethe S, Pohl C, Harms H, Kolesnikova L, Becker S, Schneider-Schaulies S** (2010) Measles virus M protein-driven particle production does not involve the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) system. *J Gen Virol* 91: 1464-1472
- Santiago C, Celma ML, Stehle T, Casasnovas JM** (2010) Structure of the measles virus hemagglutinin bound to the CD46 receptor. *Nat Struct Mol Biol* 17: 124-129
- Schlender J, Schnorr JJ, Spielhoffer P, Cathomen T, Cattaneo R, Billeter MA, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S** (1996) Interaction of measles virus glycoproteins with the surface of uninfected peripheral blood lymphocytes induces immunosuppression in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13194-13199

- Schneider-Schaulies S, Dittmer U** (2006) Silencing T cells or T-cell silencing: concepts in virus-induced immunosuppression. *J Gen Virol* 87: 1423- 1438
- Schneider-Schaulies S, Klagge IM, ter Meulen V** (2003) Dendritic cells and measles virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 276: 77-101
- Schneider-Schaulies S, Liebert UG, Baczko K, Cattaneo R, Billeter M, ter Meulen V** (1989) Restriction of measles virus gene expression in acute and subacute encephalitis of Lewis rats. *Virology* 171: 525-534
- Schneider-Schaulies S, Niewiesk S, Schneider-Schaulies J, ter Meulen V** (2001) Measles virus induced immunosuppression: targets and effector mechanisms. *Curr Mol Med* 1: 163-181
- Seita J, Weissman IL** (2010) Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2: 640-653
- Sintes J, Romero X, Marin P, Terhorst C, Engel P** (2008) Differential expression of CD150 (SLAM) family receptors by human hematopoietic stem and progenitor cells. *Exp Hematol* 36: 1199-1204
- Sonoda S, Kitahara M, Nakayama T** (2002) Detection of measles virus genome in bone-marrow aspirates from adults. *J Gen Virol* 83: 2485-2488
- Sonoda S, Nakayama T** (2001) Detection of measles virus genome in lymphocytes from asymptomatic healthy children. *J Med Virol* 65: 381-387
- Steinberg HN, Crumpacker CS, Chatis PA** (1991) In vitro suppression of normal human bone marrow progenitor cells by human immunodeficiency virus. *J Virol* 65: 1765-1769
- Sundin M, Lindblom A, Orvell C, Barrett AJ, Sundberg B, Watz E, Wikman A, Broliden K, Le Blanc K** (2008) Persistence of human parvovirus B19 in multipotent mesenchymal stromal cells expressing the erythrocyte P antigen: implications for transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 14: 1172-1179
- Tavian M, Biasch K, Sinka L, Vallet J, Peault B** (2010) Embryonic origin of human hematopoiesis. *Int J Dev Biol* 54: 1061-1065

- Taylor MJ, Godfrey E, Baczko K, ter Meulen V, Wild TF, Rima BK** (1991) Identification of several different lineages of measles virus. *J Gen Virol* 72 (Pt 1): 83-88
- Testa U** (2011) Leukemia stem cells. *Ann Hematol* 90: 245-271
- Tober C, Seufert M, Schneider H, Billeter MA, Johnston IC, Niewiesk S, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S** (1998) Expression of measles virus V protein is associated with pathogenicity and control of viral RNA synthesis. *J Virol* 72: 8124-8132
- Torisu H, Kusahara K, Kira R, Bassuny WM, Sakai Y, Sanefuji M, Takemoto M, Hara T** (2004) Functional MxA promoter polymorphism associated with subacute sclerosing panencephalitis. *Neurology* 62: 457-460
- Trentin JJ** (1971) Determination of bone marrow stem cell differentiation by stromal hemopoietic inductive microenvironments (HIM). *Am J Pathol* 65: 621-628
- Vincent S, Gerlier D, Manie SN** (2000) Measles virus assembly within membrane rafts. *J Virol* 74: 9911-9915
- Watanabe M, Wang A, Sheng J, Gombart AF, Ayata M, Ueda S, Hirano A, Wong TC** (1995) Delayed activation of altered fusion glycoprotein in a chronic measles virus variant that causes subacute sclerosing panencephalitis. *J Neurovirology* 1: 412-423
- Wild TF, Fayolle J, Beauverger P, Buckland R** (1994) Measles virus fusion: role of the cysteine-rich region of the fusion glycoprotein. *J Virol* 68: 7546-7548
- Wolf NS, Trentin JJ** (1968) Hemopoietic colony studies. V. Effect of hemopoietic organ stroma on differentiation of pluripotent stem cells. *J Exp Med* 127: 205-214
- Xiao M, Dooley DC** (2000) Cellular and molecular aspects of human CD34+ CD38- precursors: analysis of a primitive hematopoietic population. *Leuk Lymphoma* 38: 489-497

Yanagi Y, Takeda M, Ohno S (2006) Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *J Gen Virol* 87: 2767-2779

Yilmaz V, Demirbilek V, Gurses C, Yentur SP, Uysal S, Yapici Z, Yilmaz G, Muncey A, Cokar O, Onal E, Gokyigit A, Saruhan-Direskeneli G (2007) Interleukin (IL)-12, IL-2, interferon-gamma gene polymorphisms in subacute sclerosing panencephalitis patients. *J Neurovirol* 13: 410-415

Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW (1997) AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90: 5002-5012

9 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AML	akute myeloide Leukämie
APME	akute postinfektiöse Panenzephalitis
ATV	<i>adjusted</i> Trypsin Versene
BBMM	<i>basal bone marrow medium</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BFU-E	<i>bulk forming unit-Erythrocyte</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary</i> DNA
CDV	Hundestaupavirus
CFA	<i>colony forming assay</i> - Koloniewachstumsexperiment
CFSE	Carboxyfluorescein-(5-,6-) diacetat
CFU-E	<i>colony forming unit-Erythrocyte</i>
CFU-G	<i>colony forming unit-Granulocyte</i>
CFU-GEMM	<i>colony forming unit-Granulocyte Erythrocyte Monocyte Megakaryocyte</i>
CFU-GM	<i>colony forming unit-Granulocyte Macrophage</i>
CFU-M	<i>colony forming unit- Macrophage</i>
CLP	<i>common lymphocyte progenitor</i> - lymphoide Vorläuferzelle
CMP	<i>common myeloid progenitor</i> - myeloide Vorläuferzelle
CPE	<i>cytopathic effect</i> - zytopathischer Effekt
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DC	dendritische Zelle
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat

dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMV	Delphin Morbillivirus
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
ED	Edmonston
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EP	<i>erythrocyte Progenitor</i> - erythroide Vorläuferzelle
EPO	Erythropoetin
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
flt3-Ligand	<i>Fms-related tyrosine kinase 3 ligand</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
fwd	forward
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GMP	<i>Granulocyte-Macrophage progenitor</i> - Granulozyten-Makrophagen Vorläuferzelle
GP	<i>granulocyte progenitor</i> - Granulozytenvorläuferzelle
h	human
HPC	<i>hematopoietic progenitor cell</i> - hämatopoetische Vorläuferzelle
HS/PC	<i>hematopoietic stem/progenitor cell</i> - hämatopoetische Stamm-/Vorläuferzelle
HSC	<i>hematopoietic stem cell</i> - hämatopoetische Stammzelle
IgG	Immunglobulin G
IGS	intergenische Sequenz

IL2R γ	Interleukin 2 Rezeptor γ
IL-3 & IL-6	Interleukin 3 & Interleukin 6
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Media</i>
Iono	Ionomycin
KSL	c-Kit ⁺ /Sca-1 ⁺ /LIN ⁻
LIN	<i>lineage marker</i> - linienspezifische Marker
LPC	<i>leukeamic progenitor cell</i> - leukämische Vorläuferzelle
LSC	<i>leukeamic stem cell</i> - leukämische Stammzelle
M.O.I.	<i>multiplicity of infection</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MEP	<i>megakaryocyte/erythrocyte progenitor</i> - Megakaryozyt/Erythrozyt Vorläuferzelle
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MIBE	Masern-Einschlusskörper-Enzephalitis
MkP	<i>megakaryocyte progenitor</i> - Megakaryozytvorläuferzelle
MLR	<i>mixed leukocyte reaction</i>
MP	<i>macrophage progenitor</i> - Makrophagenvorläuferzelle
MPP	<i>multipotent progenitor cell</i> - multipotente Vorläuferzelle
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSC	mesenchymale Stromazelle
MV	Masernvirus
NK	natürliche Killerzeller
NOD/SCID	<i>Non-Obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> - Polymerasekettenreaktion
Pdv	Seehundestaupavirus

PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PFU	<i>plaque forming unit</i>
PI3K	Phosphoinositid 3 Kinase
PIP3	Phosphatidylinositoltriphosphat
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetat
PMV	Tümmelermorbillivirus
PPRV	Pest der kleinen Wiederkäuer-Virus
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribosenukleinsäure
RNP	Ribonukleoproteinkomplex
RPV	Rinderpestvirus
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SCF	<i>stem cell factor</i>
SDF-1	<i>stroma cell derived factor-1</i>
SLAM	<i>Signaling lymphocytic activation molecule</i>
SSC	<i>side scatter</i>
SSPE	subakute sklerosierende Panenzephalitis
STIKO	ständige Impfkommission
Tab.	Tabelle
TCID ₅₀	<i>Tissue Culture Infective Dose 50</i>
TPO	Thrombopoetin
UCB	<i>umbilical cord blood</i> - Nabelschnurblut
WTF	Wildtyp Fleckenstein
ZNS	zentrales Nervensystem

10 Veröffentlichung

Publikationen

Ibrahim Boussaad, Linda Varagnolo, Veronika Hornich, Lorenz Rieger, Matthias Krockenberger, Thorsten Stuehmer, Dietmar Kranzfelder, Albrecht M. Mueller and Sibylle Schneider-Schaulies (2011). Wild-type Measles Virus (MV) interferes with short term engraftment of human CD34+ hematopoietic progenitor cells. J Virol., in Druck

Vorträge

XX. Measles Meeting. MV Interactions with human stem cells: Consequences for viability and differentiation. Würzburg 2010

IZKF Projektleiterseminar 2010. Measles Virus interaction with human stem cells. Kloster Banz, Bad Staffelstein 2010

XIX. Measles Meeting. MV Interactions with human stem cells: Consequences for viability and differentiation. Würzburg 2009

XVIII. Measles Meeting. MV Interactions with human stem cells: Consequences for viability and differentiation. Würzburg 2008

XVII. Measles Meeting. MV Interactions with human stem cells: Consequences for viability and differentiation. Würzburg 2007

Posterpräsentationen

Epigenetics and Stem Cells Conference. MV Interactions with human stem cells: Consequences for viability and differentiation. Kopenhagen, Dänemark 2010

XVIII. Wilsede Meeting. MV Interactions with human stem cells: Consequences for viability and differentiation. Wilsede 2010

11 Danksagung

Danken möchte ich...

...Frau Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies für die Möglichkeit an diesem spannenden Projekt zu arbeiten und für ihre Betreuung und Diskussionsbereitschaft während dieser Zeit.

... Herrn Prof. Dr. Krohne für die freundliche Übernahme des Koreferats.

... Prof. Dr. Jürgen Schneider-Schaulies dafür, dass er mir einen Arbeitsplatz in seinem Labor zur Verfügung stellte und stets Diskussionsbereitschaft zeigte.

...meinen Kollegen Evi, Andi, Charlene, Elita, Caro, Susi, Hieu, Babs, Nic, Belinda und Alice dafür, dass sie ein äußerst fruchtbares Umfeld für meine Forschungsarbeit kreierten und darüber hinaus auch für viele forschungserne Aktivitäten.

...den Kollegen aus der Nachbargruppe Sabine, Sandra, Doreen, Markus, Maria, Kathrin, die mich in ihrem Labor herzlich aufnahmen.

...Herrn Prof. Dr. Albrecht Müller und seinen Mitarbeitern Linda, Vroni und Andrea, ohne die die Tierversuche nicht Möglich gewesen wären.

...den Hebammen und Ärzten der Frauenklinik Würzburg und der Missionsärztlichen Klinik Würzburg für die Unterstützung bei der Probennahme.

...Herrn Dr. Opitz aus der Transfusionsmedizin für die Leukaphereseproben.

...Sabine Rüdiger, ohne deren Unterstützung und Hilfe ich wahrscheinlich nie nach Würzburg und überhaupt so weit gekommen wäre.

...den Entdeckern Sarah Weiss und Naziha Boussaad, die von der Suche nach versteckten Tippfehlern heil zurückgekehrt sind.

...Frank Schaefer für eine relativ ruhige Rückrunde, sodass ich mir in dieser Hinsicht keine Sorgen machen musste.

...ganz besonders meiner Familie für alles und viel mehr.