

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Genexpressionsmuster und Phänotypisierung der Kaposi-
Sarkom Virus-infizierten Zellen beim Morbus Castleman

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Franziska Reichenberger geb. Peitsch

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. H.-D. Foß
 2. Prof. Dr. med. H. Merz
 3. Prof. Dr. med. H. Herbst

Datum der Promotion: 19.11.2010

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	3
Tabellenverzeichnis	3
1 Einleitung	4
1.1 Das Kaposi Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV)	4
1.1.1 Charakterisierung des KSHV	4
1.1.2 KSHV-kodierte Proteine	5
1.1.3 Zuordnung der Expression der KSHV-Gene zu viralen Infektionsformen	6
1.2 KSHV assoziierte Erkrankungen	7
1.2.1 Kaposi Sarkom.....	7
1.2.2 Morbus Castleman.....	10
1.2.3 Primary effusion lymphoma.....	11
1.2.4 Weitere Erkrankungen mit möglicher KSHV Assoziation	12
1.2.5 Zielzellen der KSHV Infektion	13
1.3 Ziele dieser Arbeit.....	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Untersuchungsmaterial.....	15
2.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	15
2.2.1 DNA-Extraktion	16
2.2.2 KSHV-PCR.....	16
2.2.3 PCR zur Generierung der Sonden.....	17
2.2.4 Gelelektrophorese	18
2.3 In situ Hybridisierung (ISH)	18
2.3.1 Herstellungsverfahren der RNA Sonden	19
2.3.2 Einfache radioaktive ISH.....	21
2.3.3 Einfache radioaktive ISH mit <i>Micrococcus nuclease</i> und DNase I... 25	
2.3.4 Einfache nicht radioaktive ISH	26
2.3.5 Simultane radioaktive und nicht radioaktive ISH.....	26
2.4 Immunhistologie (IH).....	27
2.4.1 Sequentielle APAAP-IH und radioaktive ISH	27

2.4.2	Sequentielle Peroxidase-IH und radioaktive ISH	28
2.4.3	Sequentielle Peroxidase- und APAAP-IH	29
2.5	Auswertungskriterien	31
3	Ergebnisse	32
3.1	KSHV Screening mittels PCR	32
3.2	Genexpressionsmuster und Lokalisation der KSHV positiven Zellen ...	37
3.3	Phänotypisierung der KSHV positiven Zellen	41
3.4	Epstein-Barr Virus (EBV) Nachweis in KSHV-infizierten Zellen.....	46
3.5	Zytotoxische T-Zell-Reaktion auf die KSHV-Infektion	46
4	Diskussion.....	47
5	Zusammenfassung	57
6	Literaturverzeichnis	58
7	Anhang	72
7.1	Reagentien und Lösungen.....	72
7.2	Abkürzungen.....	79
7.3	Danksagung	81
7.4	Lebenslauf.....	82
7.5	Selbstständigkeitserklärung.....	84

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: KSHV Genexpressionsmuster beim M. Castleman	39
Abbildung 2: Micrococcus nuclease-Behandlung, radioaktive ISH	40
Abbildung 3: Phänotypisierung der KSHV positiven Zellen, Kombination Immunhistologie und in situ Hybridisierung und Doppelmarkierung Immunhistologie	43
Abbildung 4: EBV und KSHV Nachweis	45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primer und PCR-Produkte zur Sondengenerierung	17
Tabelle 2: cDNA Fragmente für die Herstellung der ISH-Sonden	19
Tabelle 3: Antikörper für die Immunhistologie.....	30
Tabelle 4: Kaposi Sarkome, Papillom, chronische Tonsillitiden und Sinusi- tiden für die PCR.....	32
Tabelle 5: HIV-Lymphadenopathien, Lymphome und gastrointestinale Erkrankungen für PCR und ISH.....	34
Tabelle 6: M. Castleman-Kollektiv für PCR und ISH.....	34
Tabelle 7: Phänotyp der KSHV positiven Zellen, ISH/IH.....	42
Tabelle 8: Phänotyp der KSHV infizierten Zellen bei den M. Castleman Fällen C1 und C6a (immunhistologische Doppelmarkierung).....	42

1 Einleitung

1.1 Das Kaposi Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV)

1.1.1 Charakterisierung des KSHV

Das KSHV wurde erstmals 1994 aus dem Kaposi Sarkom isoliert und charakterisiert.¹ Es gehört zu den γ -2-Herpesvirus, Genus Rhadinovirus und ist das erste bekannte humanpathogene Virus dieser Gruppe. Es wird auch humanes Herpesvirus 8 (HHV8) genannt. Seine nächsten Verwandten sind das Herpesvirus saimiri (HVS), das equine Herpesvirus (EHV2) und das γ -1-Herpesvirus Epstein Barr Virus (EBV), die sämtlich lymphotrope Viren sind.²

Das KSHV ist ein typisches Herpesvirus mit 100-150 nm großen Partikeln mit einem Lipid *envelope* und einem Elektronendichten zentralen *core*, der das virale Genom enthält. Das reife Virion wird von einem Glykoproteinmantel umhüllt, der aus der zellulären Lipidmembran der infizierten Zelle stammt. Zwischen Kapsid und *envelope* liegt das Tegument, ein proteinreicher Raum. Das Genom ist zwischen 160 und 170 kb groß und besteht aus zwei funktionellen Einheiten, der *long unique coding region* (LUR) mit 140 bis 145 kb und flankierend den *terminal repeats* (TR) mit je 801-803 bp.^{2,3,4} Wie beim EBV liegt das Genom während der Latenz in episomaler Ringform vor, während es in linearer Form bei der lytischen Replikation vorliegt.^{114,117}

Sechs Subtypen (Subtyp A-E und Z) des KSHV konnten anhand der Analyse der Gene K1 und K15 identifiziert werden. Diese zeigen interessanterweise geographische Unterschiede in der Verteilung. Eine Assoziation der Subtypen zu klinischen Erscheinungsbildern konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.⁵

Aufgrund ihrer Homologie werden die beim KSHV identifizierten Gensequenzen (open reading frame [ORF]) nach den ORF des HVS benannt und die nicht homologen mit dem Präfix K (K1-K15) bezeichnet.² In der LUR sind bisher 90 ORF identifiziert, die zum Teil signifikante Homologien zu humanen Genen aufweisen. 66 ORF kodieren für die Struktur- und Replikationsproteine des Virus und andere für Zellzyklusregulations- und Signalproteine.³

1.1.2 KSHV-kodierte Proteine

Die Identifizierung der viralen Proteine und deren Funktionsweise sind von entscheidender Bedeutung für das Verständnis des Infektionsmusters, der Persistenz im Organismus und der Pathogenese der KSHV-assoziierten Erkrankungen.

Zu den identifizierten und charakterisierten viralen Proteinen gehören Zellzyklus-Regulationsproteine wie virales Cyclin D1, virales FLIP und Kaposin (T0.7, K12), und Signalproteine wie das Zytokin virales IL6, die Chemokine virales MIP-I, II und III und der Chemokinrezeptor virales GPCR. Bis auf Kaposin sind die genannten homolog zu humanen Proteinen und standen daher im Mittelpunkt des Interesses der vorliegenden Arbeit.

Die verschiedenen Proteine könnten bei der Tumorentstehung durch das KSHV eine wichtige Rolle spielen.

1. vCyclin D1: wird von ORF72 kodiert.^{3,6,69} Es induziert über eine cdk6 (*cyclin-dependent kinase*) den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus, indem das Tumorsuppressor Retinoblastom-Protein (pRb) und das Histon H1 phosphoryliert und damit inaktiviert werden.^{7,8,9,10,69} Durch eine in der Aminosäuresequenz veränderte Untereinheit entzieht sich der Komplex der Inhibition durch CDK-Inhibitor Proteine. An Fibroblasten konnte *in vitro* die Progression des Zellzyklus über die G1-Phase hinaus durch die Expression von vCyclin demonstriert werden.^{10,11,69}
2. vFLIP: (ORF71) Virales FLICE (*Fas-associated death domain-like interleukin-1 β -converting enzyme*) Inhibitor Protein (vFLIP) hemmt die TNF-medierte Apoptose. Es blockiert die Kaspasen in der Signalkaskade des Fas Rezeptors (CD95). Dadurch kann die über TNF vermittelte T-Zell induzierte Apoptose verhindert werden.^{12,13,14,72} Des weiteren aktiviert vFLIP die NF κ B-assoziierte Signaltransduktion, über die eine Vielzahl immunmodulatorischer Gene induziert werden. Hierdurch kann eine NF κ B Aktivierung zu einer Transformation führen.¹⁵
3. Kaposin (T0.7 RNA, ORF K12) Kaposin A ist ein Typ II Membranprotein, das Cytohesin-1 an die Membran rekrutiert und dadurch die ERK1/2 MAP Kinase Signaltransduktion aktiviert. Über das β -Integrin ICAM-1 führt es zur Reorganisation des F-Actins und zur Lymphozyten Aggregation und Adhäsion.¹⁶ *In vivo* Studien an Ratten mit Kaposin A transfizierten *rat-3* Zellen führten zur Ausbildung von vaskularisierten hochgradig undifferenzierten Fibrosarkomen.⁷⁴

4. vIL-6: Virales Interleukin-6 wird durch den ORF K2 kodiert.^{17,18,53} Es hat ähnliche biologische Eigenschaften wie das humane IL6 (huIL6) und aktiviert den STAT und MAP Kinase Signalweg.^{19,17,20} So stimuliert es die Angiogenese über die Induktion von VEGF, die Hämatopoese und das B-Zell-Wachstum, wirkt proinflammatorisch und antiapoptotisch. Zudem induziert es die Sekretion von huIL6.^{10,12,17,18,19,21,22,23,24,70} vIL-6 schützt die KSHV-infizierten Zellen vor dem Interferon- α medierten Arrest des Zellzyklus dadurch, dass IFN- α über eine *downregulation* der gp80-Untereinheit des IL-6-Rezeptors wirkt und vIL-6 unabhängig davon seine Wirkung über die gp130-Untereinheit des IL-6R erzielt. So trägt vIL-6 zur Persistenz des Virus im Organismus bei. So könnte auch die virale Produktion vermehrt werden, indem das Zellüberleben während der lytischen Replikation verlängert wird.^{17,19,25}
5. vMIP-I/-II/-III: Die *macrophage inflammatory proteins* (MIP) werden von den ORF K6, K4 und K4.1 kodiert.^{18,26} Sie aktivieren Chemokinrezeptoren der Th2 Lymphozyten (CCR4 und 8) und könnten so eine Änderung der antiviralen Th1 Immunantwort bewirken. Zudem stimulieren sie die Angiogenese über die Induktion von VEGF.^{12,18,26,27,28}
6. vGPCR: Der virale *G protein-coupled receptor* wird durch ORF74 kodiert und hat signifikante Homologie zum IL8-R.^{6,29,71} Er aktiviert über eine Phosphatidylinositol-Signaltransduktion, die wiederum zur Aktivierung von JNK, NF κ B, ERK und p38 Signalwegen führt, die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Dadurch wird die zelluläre Proliferation der Fibroblasten und in besonderem Maße via VEGF die Angiogenese stimuliert.^{12,29,30,31,32,33} An transgenen Mäusen konnten über die Expression von vGPCR KS-ähnliche Läsionen erzeugt werden, so dass dieser Rezeptor wahrscheinlich entscheidend zur Pathogenese der KSHV-assoziierten Erkrankungen beiträgt. Da vGPCR von nur maximal 10% der Zellen dieser KS-ähnlichen Läsionen exprimiert wird, werden parakrine Wirkmechanismen diskutiert.^{29,34}

1.1.3 Zuordnung der Expression der KSHV-Gene zu viralen Infektionsformen

Grundsätzlich wird zwischen einer latenten und lytischen viralen Infektion unterschieden. Herpesviren regulieren die Expression ihrer Gene strikt entsprechend der vorliegenden Infektionsform, so dass die Gene grob in drei Klassen eingeteilt werden

können: zum einen Gene, die während einer latenten Infektion exprimiert werden und zur Persistenz des Virus im Organismus führen, und zum anderen Gene, die in der frühen bzw. späten Phase der lytischen Infektion exprimiert werden und so zum Zelluntergang und zur Freisetzung neuer Herpesviren führen.

Für das KSHV konnten die Gene anhand verschiedener PEL-Zelllinien eingeordnet werden. Die Zelllinien sind latent mit dem KSHV infiziert und wurden mit Tetradeconoylphorbol-Acetat (TPA) oder n-Butyrat zum Übergang in die lytische Infektion induziert.^{24,27,35,36,37,38}

1. Die Gene der ersten Klasse werden während einer latenten Infektion konstitutiv gebildet und können nicht weiter durch Stimulierung mit TPA oder n-Butyrat in ihrer Produktion gesteigert werden. Hierzu gehören das Kaposin A, vLANA, vFLIP und vCyclin.^{9,12,24,27,37,39,40}
2. Die Gene der zweiten Klasse werden erst nach chemischer Stimulierung durch TPA oder n-Butyrat transkribiert.⁴¹ Es handelt sich hier vor allem um die viralen Zytokine und Signaltransduktionsmoleküle. Sie zeigen den Eintritt in die lytische Infektion an und können in *immediate early* und *early* weiter unterteilt werden.
 - Die *immediate early* Gene umfassen die ORF K3, K5, K8 (Homolog zum EBV ZEBRA-Gen) und Rta (R transcript activator), das den Übergang vom latenten zum lytischen Zyklus initiiert.^{12,27,37,42,43}
 - Zu den *early* Genen werden das vIL-6, vMIP-I, vMIP-II, der ORF K7 (T1.1/PAN-RNA), das vIRF, vbcl-2, vDHRF, vGPCR und der ORF 70 gezählt.^{24,27,29,37,38,42,44,45,46}
3. Die dritte Klasse der Gene enthält die spät im lytischen Zyklus exprimierten Gene (*late genes*), die vor allem Struktur- und Replikationsgene sind. Auch sie werden in PEL-Zelllinien erst nach chemischer Stimulation gebildet. Man rechnet die ORF K10, K11, 59 (PF-8 [*processivity factor*]), 65 und das vMCP dazu.^{24,27,37,38,47}

1.2 KSHV assoziierte Erkrankungen

1.2.1 Kaposi Sarkom

Das Kaposi Sarkom (KS) ist ein ursprünglich seltener mesenchymaler Tumor, der überwiegend bei älteren Männern aus dem Mittelmeerraum in Form eines Hauttumors auftrat.⁴⁸ Im Rahmen der HIV-Epidemie trat das KS erstmals in den meisten

Teilen Europas und den USA mit einer gewissen Häufigkeit bei immunsupprimierten HIV+ Patienten auf.⁴⁹

Histologisch ist das KS charakterisiert durch die Proliferation mesenchymaler Spindelzellen. Neben diesen, für das KS typischen Spindelzellen findet man Kapillaren und mit extravasalen Erythrozyten gefüllte Spalträume. Oft ist ein entzündliches Infiltrat vorhanden, bestehend aus Plasmazellen und Lymphozyten.⁴⁹

An der Haut manifestiert sich das KS am häufigsten, aber auch Schleimhäute, Lymphknoten (LK) und innere Organe können beteiligt sein. Vier klinische Formen des KS werden unterschieden:

1. Klassische Form: Betroffen sind zumeist ältere Männer in Süd-Ost-Europa mit kutaner Manifestation überwiegend an den Unterschenkeln und langsamen Verlauf über Jahrzehnte.^{48,49}
2. Lymphadenopathische Form: Vor allem Kleinkinder in Zentralafrika zeigen diese Form. Das KS manifestiert sich als Lymphadenopathie und nur selten kutan. Der fulminante Verlauf wird der raschen Generalisierung mit Beteiligung der inneren Organe zugeschrieben.
3. Transplantations-assoziierte Form: Sie tritt im Mittel 16 Monate nach Transplantation bei immunsupprimierten Patienten, meist in viszeral generalisierter Form auf. Die Prognose ist dementsprechend schlecht.
4. AIDS-assoziierte Form: 30% aller AIDS-Patienten entwickeln zunächst ein kutanes KS, das im Verlauf generalisiert und mit einer schlechten Prognose einhergeht. Nicht selten wird die HIV Infektion erst mit dem Auftreten des KS diagnostiziert.⁴⁹

Da das AIDS-assoziierte KS besonders häufig bei HIV-infizierten Homosexuellen (ca. 40%) im Vergleich zu HIV-Infizierten mit anderen Risikoverhalten (ca. 5%) auftritt, lag die Vermutung nahe, dass ein infektiöses Agens, das durch sexuellen Kontakt übertragen wird, ursächlich für die Entstehung eines KS ist.^{50,51} 1994 sind dann tatsächlich virale Sequenzen aus KS isoliert worden. Diese DNA Sequenzen eines neuen Herpesvirus wurden mittels PCR in über 90% der AIDS-assoziierten Form des KS identifiziert. Es handelt sich um das KSHV bzw. HHV8.¹

Ausgedehnte Untersuchungen mittels PCR konnten zwischenzeitlich belegen, dass auch bei den anderen drei KS-Formen KSHV-Sequenzen in über 90% der Fälle nachzuweisen sind.^{52,53,54,55,56,57,58,59}

Um zu belegen, dass tatsächlich ein pathogenetischer Zusammenhang zwischen der KSHV-Infektion und der Entstehung des KS besteht, wurden zum einen seroepidemiologische Untersuchungen durchgeführt und zum anderen die transformierenden Eigenschaften des Virus analysiert.

So zeigte sich, dass die KSHV-Seroprävalenz am höchsten in Populationen mit einem hohen Risiko für das Auftreten eines KS ist. Anti-KSHV-Antikörper (AK) finden sich bei 30-93% der homosexuellen HIV+ Patienten, 32-80% der afrikanischen Bevölkerung und bei 4-31% der Bevölkerung des Mittelmeerraumes. Dagegen können in der amerikanischen Normalbevölkerung nur zu einem sehr geringen Prozentsatz anti-KSHV-AK (0-8%) nachgewiesen werden.^{51,60,61,62,63,64,65,66}

Prospektive Studien zeigten, dass das Auftreten von anti-KSHV-AK ein prädiktiver Faktor für die Entstehung eines KS ist. Zudem existiert eine positive Korrelation zwischen der Viruslast und dem klinischen Verlauf des KS. Die Viruslast steigt mit der Progression der Erkrankung nachweisbar an.^{60,66,67,68}

Die transformierenden Eigenschaften einiger KSHV-Genprodukte wie zum Beispiel vCyclin D1, vFLIP, Kaposin, ORF K1, vIL-6 und vGPCR weisen ebenfalls auf einen pathogenetischen Zusammenhang zwischen KS und KSHV hin. So werden durch sie B- und T-Zellen aktiviert und immortalisiert, die Angiogenese stimuliert, Fibroblasten zur Proliferation angeregt und die Apoptose inhibiert. Die histologischen Veränderungen beim KS können also durch eine KSHV-Infektion hervorgerufen werden.^{69,70,71,72,73,74}

Desweiteren konnte mittels *in situ* Hybridisierung das KSHV in den Spindelzellen und CD34+ Endothelien lokalisiert werden.^{9,12,75,76,77,78,79,80,98,100} Aber auch das KS infiltrierende CD45+ und CD68+ Monozyten sind zu einem kleinen Prozentsatz (1%) KSHV positiv.^{9,24,30,81,82}

Die Zahl der KSHV infizierten Zellen nimmt mit Fortschreiten des KS zu, d.h. das in den frühen KS-Läsionen nur ca. 1-3% der Zellen mit dem Virus infiziert sind, während im späten Stadium bis zu 90% der Zellen positiv sind.^{77,79,80}

Latente Gene wie das Kaposin, vCyclin D1 und vLANA sind im späten Stadium in fast allen Spindelzellen (>90%) nachweisbar.^{9,24,27,45,78,79,98,100} Dagegen werden Gen-Transkripte, die eine lytische Infektion anzeigen, von nur wenigen Zellen exprimiert (<1%), z.B. vIL-6, vMCP, vIRF1, PF-8, vMIP-I/-II. Der vorherrschende Infektionstyp ist also eine latente Infektion des KS durch das KSHV.^{18,24,27,76,79,83,98}

1.2.2 Morbus Castleman

Der Morbus Castleman ist eine vergleichsweise seltene lymphoproliferative Erkrankung mit charakteristischen histologischen und klinischen Befunden. Je nach Ausdehnung der Erkrankung liegt klinisch ein lokalisierter oder multizentrischer M. Castleman (MCD) vor. Der MCD ist histologisch vor allem mit dem plasmazellreichen Typ assoziiert und tritt besonders häufig bei HIV positiven und negativen KS Patienten auf.^{23,56,84}

Histologisch werden zwei Typen des M. Castleman unterschieden:

1. Hyalin-vaskulärer Typ (ca. 90% der Fälle) Dieser ist von abnormen, hypervaskularisierten Follikeln mit je ein oder zwei atrophierten und hyalinisierten Keimzentren sowie vergrößerten, z.T. zwiebelschalenartig geordneten Mantelzonen geprägt. Eine vermehrte interfollikuläre Vaskularisation ist ebenfalls typisch. Die Patienten sind zumeist asymptomatisch und werden durch eine Lymphadenektomie geheilt.^{85,86,87}
2. Plasmazellreicher Typ (ca.10% der Fälle) Dieser Typ ist histologisch durch erweiterte Sinus, hyperplastische, abnorme Keimzentren mit z.T. vermehrter Vaskularisation und eine interfollikuläre Plasmozytose gekennzeichnet.^{85,86,136} Die Plasmazellen (PZ) exprimieren poly- oder monotypisch leichte Immunglobulinketten.⁸⁸ Klinisch finden sich systemische Symptome wie Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsabnahme, generalisierte Lymphadenopathie, Hepatosplenomegalie, erhöhte IL-6 Spiegel und eine polyklonale Hypergammaglobulinämie. Die Prognose ist schlecht.^{18,85,98}

In Fällen mit beiden Merkmalen spricht man von einem gemischten Typ.⁸⁵

Der plasmazellreiche MCD ist eine Ausschlussdiagnose, da die histologischen Veränderungen unspezifisch sind. Sie treten in dieser Form auch bei Autoimmunerkrankungen, primären und erworbenen Immundefekten, Malignomen, Hauterkrankungen und nach Impfungen auf.^{23,86,136}

Aufgrund des gehäuftten Auftretens des MCD bei KS Patienten wurde ein gemeinsamer ätiologischer Faktor diskutiert. Mit der Identifizierung des KSHV stellte sich die Frage, ob das Virus dieser gemeinsame Faktor ist.

Mittels PCR Analysen konnte das KSHV in einem Großteil von MCD Fällen bei HIV+ Patienten und bei ca. 30-40% der HIV- MCD Fälle nachgewiesen werden. Der hyalin-vaskuläre Typ des M. Castleman ist dagegen zumeist negativ für das Virus.

Schon frühere immunhistologische Untersuchungen zeigten, dass sich in den Keimzentren und der interfollikulären Zone der Castleman Tumoren sehr viel IL6 produzierende Zellen nachweisbar sind.⁸⁶ Dem IL6 wird eine zentrale Rolle in der Pathogenese des M. Castleman zugeschrieben, da es u.a. eine Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen induziert.^{10,23,24,33,86,98} Da ein virales IL6 mit Homologie zum humanen IL6 im KSHV-Genom kodiert ist, stellte sich die Frage, ob das KSHV an der Pathogenese des MCD beteiligt sein könnte.^{4,23} Klinische Untersuchungen zeigen zudem, dass der Serumspiegel des KSHV und des vIL-6 sich analog der Klinik des M. Castleman ändert.^{91,92} Therapeutische Ansätze mit monoklonalen Antikörpern gegen IL6 können die Symptome der MCD zum Abklingen bringen.^{23,93} Unklar ist, ob das humane oder virale IL6 für die histologischen und klinischen Veränderungen beim MCD verantwortlich ist bzw. ob sich hier ein Synergismus der beiden IL6 Typen ergibt.

Erste Hinweise auf den Phänotyp der infizierten Zellen gab eine einzelne Arbeit. Mittels ISH und Immunhistologie konnte gezeigt werden, dass die KSHV positiven Zellen vor allem in der Mantelzone der Follikel zu finden sind und negativ für CD20, CD138, CD45RO, CD3, CD68, CD30 und EMA und zudem EBV negativ sind.²³ In der gleichen Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Zellen vIL-6 exprimieren. Es wurde aber zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch nicht ausführlich der Frage nachgegangen, welche Zellen beim M. Castleman mit dem KSHV infiziert sind und welche Gene exprimiert werden bzw. welcher Infektionstyp vorliegt. Dies ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.2.3 Primary effusion lymphoma

Dieses seltene AIDS-assoziierte B-Zell-Lymphom tritt in Körperhöhlen auf und bildet meist kein solides Tumorgewebe aus. Die ursprüngliche Bezeichnung *body cavity-based lymphoma* (BCBL) wurde durch *primary effusion lymphoma* (PEL) ersetzt. Eine Infektion der Tumorzellen (TZ) mit dem KSHV ist ein definierendes Merkmal dieser Erkrankung.^{94,95,96,97,102}

Das PEL besteht aus großen, zytoplasmareichen Zellen mit prominenten Nukleoli und vielen Mitosen. Morphologisch sind die TZ sehr heterogen mit anaplastischen bzw. Immunoblasten/Plasmablasten ähnelnden Merkmalen.^{10,36,97,98}

Klinisch präsentieren die Patienten Ergüsse in zumeist nur einer Körperhöhle. Lymphadenopathien oder Organomegalien sind nicht typisch. Ein gemeinsames Auftre-

ten des PEL mit anderen KSHV-assoziierten Krankheiten ist beschrieben worden. Die Prognose ist extrem schlecht.^{10,97,99}

Immunphänotypische Untersuchungen zeigen, dass die Zellen positiv für das *leukocyte common antigen* CD45 und plasmazelltypische Antigene CD38 und CD138 bzw. den Aktivierungsmarker CD30 sind.^{10,94,97,100,101} Immunglobuline werden meist nicht gebildet.^{10,97} Die PEL-Zellen exprimieren EMA, ein Antiadhäsionsmolekül, das in Metastasierungsprozessen eine Rolle spielt.^{18,35,96} Die B-Zell-Marker CD19, CD20 und CD79a konnten nicht nachgewiesen werden.^{94,97}

Da in nahezu allen TZ des Lymphoms das KSHV nachgewiesen werden kann, wurde das virale Genexpressionsmuster mittels ISH und immunhistologischer Methoden untersucht. Dabei zeigte sich, dass latente Transkripte wie vLANA, vCyclin und Kaposin von der Mehrzahl der Zellen gebildet wird, während lytische Transkripte wie vIL-6, vGPCR, vbcl-2, vMIP-I/II und vIRF von höchstens 5% der Zellen exprimiert werden.^{10,24,98,110} Aus diesen Untersuchungen wird deutlich, dass das PEL vornehmlich latent mit dem KSHV infiziert ist.

Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass das PEL häufig mit dem EBV koinfiziert ist. Das EBV liegt in monoklonaler Form mit identischen *terminal repeat* Sequenzen in allen Zellen vor. Die Infektion ist daher der malignen Transformation voraus gegangen. Im Gegensatz zum Burkitt-Lymphom findet sich keine Translokation unter Beteiligung des c-myc-Gens.^{10,36,39,94,102,103,104}

1.2.4 Weitere Erkrankungen mit möglicher KSHV Assoziation

Die Entdeckung und Charakterisierung des KSHV führte dazu, dass auch andere Krankheiten mit unklarer Ätiologie auf einen möglichen Zusammenhang mit dem Virus überprüft wurden.

So wird er in bezug auf das multiple Myelom (Plasmozytom) und monoklonale Gammopathien unklarer Signifikanz (MGUS) sehr kontrovers diskutiert. Rettig *et al.* konnten das Virus in dendritischen Zellen des Knochenmarks nicht aber in den neoplastischen Zellen bei o.g. Patienten nachweisen. Dies wäre von großer Bedeutung, da es ein neuer, indirekter Mechanismus des KSHV wäre, in die Plasmazelldifferenzierung einzugreifen. Diese Ergebnisse konnten von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden.^{105,106,107}

Auch beim M. Waldenström, Posttransplantat-Hauttumoren, Lupus erythematosus, Kikuchi-Lymphadenitis (einer benignen lymphoproliferativen Erkrankung), bei AIDS-

assoziierten *anaplastic large cell lymphomas* (ALCL) und bei ZNS-Lymphomen wird eine KSHV-bedingte Pathogenese diskutiert, jedoch sind für eine definitive Aussage zu geringe Fallzahlen dieser Erkrankungen auf das Virus untersucht worden.
55,56,95,107,108,109,110,111,112

1.2.5 Zielzellen der KSHV Infektion

Um mögliche Übertragungswege des KSHV zu identifizieren, muss das Reservoir des Virus im Menschen gefunden werden. Dazu ist zu klären, welche weiteren Zellen vom KSHV infiziert sind und ob es in ihnen persistiert.

Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass das Virus eindeutig lymphotrop ist. Er wurde in CD19 und CD20+ B-Zellen identifiziert. CD2 und CD3+ T-Zellen können auch infiziert sein, allerdings in einem viel geringeren Ausmaß.^{52,67,84,98,113,114,115,116}

Des Weiteren wurde das Virus aus CD68+ peripheren Monozyten sowohl bei KS als auch MCD isoliert. Hier wird auch der Ort seiner Replikation vermutet, weil das Genom in den Monozyten in linearer Form vorliegt, während es in den Spindelzellen des KS in episomaler Form gefunden wird.^{54,67,68,9,24,84,102,117}

Außerhalb des lymphatischen Systems wurde das KSHV in der gastrointestinalen Mukosa sowie im Prostatasekret und abnormen Prostataepithel von HIV-Infizierten gefunden. Sperma und Speichel könnten daher infektiös sein, wobei es hierzu divergierende Ergebnisse gibt.^{52,68,79,118,119,120,121} Die Haut als größtes Epithelgewebe und Manifestationsorgan des kutanen KS war auch Gegenstand von Untersuchungen. Eine Studie zeigte, dass 82% der Hauttumore bei Transplantierten KSHV positiv sind.¹⁰⁸ Dies konnte jedoch in weiteren Untersuchungen nicht bestätigt werden.
53,55,57,58,122

1.3 Ziele dieser Arbeit

Mit der Identifizierung des KSHV als ein Faktor in der Pathogenese des KS, stellt sich die Frage, ob das KSHV auch bei der multizentrischen Variante des M. Castleman, die gehäuft bei KS-Patienten auftritt, nachzuweisen ist. Gegenstand dieser Arbeit soll daher sein, die Assoziation des KSHV mit dem M. Castleman näher zu beleuchten.

Dazu soll untersucht werden, mit welcher Frequenz sich das Virus bei den verschiedenen M. Castleman Fällen und als Vergleichsgruppe bei HIV-Lymphadenopathien nachweisen lässt. Anschließend soll bei den KSHV positiven M. Castleman Fällen

das virale Genexpressionsmuster mittels *in situ* Hybridisierung charakterisiert werden. Dadurch kann auch der Infektionstyp des KSHV beim M. Castleman identifiziert werden. Zudem sollen die Zielzellen des KSHV und deren Phänotyp durch immunhistochemische Methoden in Kombination mit *in situ* Hybridisierung charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

Die Herstellung und Herkunft aller verwendeten Materialien und Lösungen sind im Anhang unter 7.1 aufgeführt.

2.1 Untersuchungsmaterial

Die Lymphadenektomiepräparate von 43 Patienten mit M. Castleman oder Lymphknotenveränderungen mit Merkmalen eines M. Castleman (hyalin-vaskulärer, plasmazellreicher sowie gemischter Typ) aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Benjamin Franklin (UKBF) wurden für diese Arbeit verwendet. Sie waren in 4%igen Formalin fixiert und anschließend mittels Routineverfahren in Paraffin eingebettet.

Als Kontrollen dienten 13 Kaposi Sarkome, 10 HIV-Lymphadenopathien, 7 Fälle von chronischer Tonsillitis, 5 Fälle von chronischen Sinusitiden und 1 Fall eines NNH-Papillom, 2 Fälle von malignen Lymphomen, 1 Fall von chronischer Gastritis und ein hyperplastischer Colonpolyp sowie für die EBV-Nachweise 4 Hodgkin-Lymphom-Fälle und 1 Tonsillektomiepräparat bei infektiöser Mononukleose, ebenfalls aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des UKBF.

2.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR diene in der vorliegenden Arbeit dem initialen Screening der zu untersuchenden Gewebe auf eine KSHV-Infektion und zur Herstellung der Ribosonden für die *in situ* Hybridisierung. Mittels dieser Methode können spezifische DNA-Sequenzen vervielfältigt werden.

Die Amplifikation der Sequenzen verläuft in Zyklen, wobei ein Zyklus aus der

1. Denaturierung der DNA zu Einzelsträngen,
2. dem Annealing, d.h. dem Anlagern der Oligonukleotidprimer an die Einzelstränge, und
3. der Verlängerung der Primer durch die *Taq*-Polymerase besteht.

Die Oligonukleotidprimer sind so gewählt, dass der zu amplifizierende Bereich der DNA von ihnen flankiert wird.

2.2.1 DNA-Extraktion

Die DNA wurde aus 25µm dicken Schnitten der zu untersuchenden Morbus Castleman, Kaposi Sarkome bzw. HIV-Lymphadenopathien mit Hilfe eines DNA-Extraktionssets (Quiagen, Hilden) nach dem *tissue protocol* gewonnen. Dazu wurden die Schnitte mit Xylol entparaffiniert und die DNA mit unvergälltem Ethanol gefällt. Nach der Lyophilisierung wurde das Produkt unter Zusatz von Puffer über zwei Tage mit Proteinase K gereinigt. Anschließend konnte die DNA mittels mehrerer Zentrifugationsschritte an die QIAmp Silikamembran in der Spinsäule gebunden und so isoliert werden. Die Eluation der gereinigten DNA fand bei 70°C mit dem mitgelieferten Puffer statt. Bei einer Wellenlänge von 260nm wurde die Extinktion im Photometer (Hewlett Packard) gemessen und daraus die DNA-Konzentration ermittelt. Gelagert wurde die DNA bei -20°C.

2.2.2 KSHV-PCR

Eine verschachtelte (*nested*) PCR nach Saiki *et al.* zum Nachweis des viralen Genoms wurde entwickelt.¹²³ In zwei Amplifikationsschritten mit folgendem Primerpaaren von Moore *et al.*¹²⁴ konnte das KSHV identifiziert werden:

1. Amplifikation

KSHV1.*up*: 5'-AgC ACT CgC Agg gCA gTA Cg-3'

KSHV1.*low*: 5'-gAC TCT CTg Atg AAC Tgg-3'

Die Amplifikatlänge betrug 571bp.

2. Reamplifikation

KSHV1R.*up*: 5'-AgC CgA AAg gAT TCC ACC AT-3'

KSHV1R.*low*: 5'-TCC gTg TTg TCT ACg TCC Ag-3'

Das Amplifikat der Reamplifikation war 233bp lang.

Der Reaktionsansatz enthielt zwischen 1-3µg genomische DNA, 2,5U *Taq* DNA Polymerase, 100ng der beiden Primer, 1µl dNTPs, 1µl *Taq* spezifischen 10× Puffer, 8µl 25mM MgCl₂ und *Aqua a.i.* bis zu einem Volumen von 100µl. Der Reaktionsansatz für die Reamplifikation wurde mit 1µl Amplifikat statt genomischer DNA angesetzt. Die Amplifikationen (im Thermocycler *GeneAmp* PCR System 9600, Perkin Elmer) begannen mit der initialen Denaturierung über 2 min bei 95°C. Der Zyklus lief dann 40 sec bei 95°C (Spreizen), 50 sec 58°C (Annealing) und 1 min 72°C (Verlängern) und wurde 35× wiederholt. Anschließend wurde die Temperatur für 10 min auf 72°C gehalten, bevor auf 4°C gekühlt wurde.

2.2.3 PCR zur Generierung der Sonden

Die Generierung der Sonden erfolgte mittels PCR aus bekannten KSHV positiven KS-Fällen. Die DNA-Extraktion erfolgte nach oben genannter Methode (s. Abschnitt 2.2.1, S.16). Die benötigten Primer wurden anhand der Genbank der Pubmed und den bereits erschienenen Publikationen mit Hilfe des Computerprogramms „Primer“ (Version 0.5, Whitehead Institute for Biomedical Research, 1991) erstellt.^{1,2,4,14,20,45,124,125} Die Länge der Amplifikate betrug zwischen 0,5 und 1kb, welche für eine optimale Gewebepenetrierung im Rahmen einer ISH geeignet ist. Die PCR-Bedingungen waren wie folgt: 2 min 95° (Denaturierung), 30 sec 95 ° (Spreizen), 40 sec 60° (Annealing), 40 sec 72° (Verlängern) über 40 Zyklen und abschließend 10 min bei 72°. Die Angaben zu den PCR-Primern und -Produkten sind in der Tabelle 1 enthalten. Die entstandenen PCR-Produkte wurden sequenziert (DNA Sequencer 373, Applied Biosystems, Weiterstadt, D) und auf ihre Richtigkeit mit den Angaben der Literatur verglichen.¹²⁵ Die weitere Verfahrensweise zur Sondengenerierung ist in Abschnitt 2.3.1 (S.19-20) beschrieben.

Tabelle 1: Primer und PCR-Produkte zur Sondengenerierung

Sonde	Primerpaar	PCR-Produkt
vCyclin D	vCycD.up.5'-CAg AAT gCg CAg ATC AAA gTC-3' vCycD.low.5'-CAA CTg CCA TAA CCC gC-3'	Länge 758 bp
vFLIP	vFLIP.up.5'-gCg ATA gTg TTg ggA gTg-3' vFLIP.low.5'-TCT CTg TgA ggT ggC gC-3'	Länge 538 bp
vGPCR	vGPCR.up.5'-TAT gAg Cgg ATA TgA CTA CTC Tgg-3' vGPCR.low.5'-AAC CAC ggC gCT gTA CAg-3'	Länge 865 bp
vIL-6	vIL-6.up.5'-Tgg gAT AgA gTC CAA AAC ACg-3' vIL-6.low.5'-Tgg TCT CTC TTg CTg gTC g-3'	Länge 567 bp
vLANA	vLANA.up.5'-ACC TTg ggg ggA CgA TAg-3' vLANA.low.5'-CCC TTA ACg AgA ggA AgT TgT Ag-3'	Länge 579 bp
vMCP1	vMCP1.up.5'-AAA gCg CTC gTA ACC ACg-3' vMCP1.low.5'-TgT AAg TCA gCg TCA ggg C-3'	Länge 964 bp
vMIP-1α	vMIP-1α.up.5'-gCT gCC TAA CCC AgT TTT Tg-3' vMIP-1α.low.5'-CCg TCC ACg TTT TAT gCT g-3'	Länge 252 bp

Abkürzung: bp: Basenpaare

2.2.4 Gelelektrophorese

Die Elektrophorese zum Nachweis der PCR-Produkte erfolgte auf 6%igen Acrylamidgelen. Die DNA-Banden wurden mit Ethidiumbromid eingefärbt und durch UV-Licht sichtbar gemacht. Dazu wurden die Gele auf einen UV-Transilluminator (Kaiser) gelegt und durch eine Geldokumentationsanlage (Mitsubishi) der Auswertung zugänglich gemacht.

2.3 In situ Hybridisierung (ISH)

Mittels ISH können DNA- und RNA-Sequenzen in Geweben, Zellen und intrazellulären Strukturen spezifisch nachgewiesen werden. Das Hybridisierungssignal wird direkt im biologischen Präparat sichtbar. Für diese Arbeit wurde das Protokoll von Angerer *et al.*¹²⁶ modifiziert durch Milani *et al.*¹²⁷ zum Nachweis von RNA-Transkripten verwendet.

Da allerdings ubiquitär vorkommende RNasen die Zielmoleküle abbauen können, müssen folgende Bedingungen, die eine RNase-Freiheit ermöglichen, bei den Versuchen eingehalten werden:

1. Das Tragen von Einmalhandschuhen.
2. Die Verwendung von Einmalplastikwaren.
3. Das Backen von Glasgefäßen und Deckgläsern für 5 Stunden bei 250°C in einem Heizofen (*Heraeus*) vor der Verwendung zur RNasen-Inaktivierung. (Die Deckgläser wurden vorher fächerförmig in Standküvetten sortiert, für 20 min in 0,2N HCl und 10 min in 100% Ethanol inkubiert.)
4. Der Zusatz von 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC), einem RNase-Inhibitor, zu den Lösungen und dem *Aqua bidest.* mit anschließendem Autoklavieren über 15 min.
5. Die Glassachen wurden mit Alufolie abgedeckt und staubfrei gelagert.

Damit sich die Schnittpräparate während der ISH nicht ablösen, wurden die Objektträger vor ihrer Verwendung mit APES beschichtet. Sie wurden dazu für 5 min in 100% Aceton, anschließend für 5 min in 2% 3-Aminopropyltriethoxysilan (APES) in Aceton eingelegt, wurden 2× kurz in Aceton getaucht und 2× kurz in Depc-H₂O gespült. Über Nacht wurden sie bei 37°C im Wärmeschrank getrocknet.

Aus dem gleichen Grund wurden die Deckgläser silikonisiert, indem sie mit Silikonlösung beschichtet und für 2 Std. auf 117°C erhitzt wurden.

2.3.1 Herstellungsverfahren der RNA Sonden

Nach Standardmethoden wurden die in der PCR amplifizierten Sequenzen in Vektoren (Plasmide) kloniert, die Transkriptionsstartpunkte für RNA-Polymerasen enthielten.¹²⁸ Die so in Plasmiden klonierte cDNA wurde in *E. coli* transformiert, dann vermehrt und aufgereinigt. Die Linearisierung erfolgte mit dem entsprechenden Restriktionsenzym in zwei Ansätzen. Ein Ansatz bestand aus 20µl DEPC-H₂O, 10µl 10x Restriktionsenzym puffer, max. 20µl Plasmid-DNA und 5µl Restriktionsenzym, wurde vorsichtig gemischt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Eine Ethanol-Extraktion wie in den Abschnitten 2.3.1.1 (S.20-21) und 2.3.1.3 (S.21-22) beschrieben schloss sich nun an. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 20µl DEPC-H₂O gelöst. Ein Minigel (1% Agarose) wurde mit 0,5µl Produkt gemacht, um zu überprüfen, ob die gesamte Plasmid-DNA linearisiert vorlag. Die linearisierte cDNA lagerte bei -20°C bis zur weiteren Verwendung.

Die Nukleinsäure-Sequenz aller Sonden wurde mit einem DNA Sequencer (373 Applied Biosystems, Weiterstadt, D) bestimmt und ihre Richtigkeit durch einen Vergleich mit den Angaben der Literatur verifiziert.^{2,3,14,45,125,127,129} Die verwendeten Sonden mit ihrer Herkunft, Klonierung, Länge und Orientierung des Inserts sind in der Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: cDNA Fragmente für die Herstellung der ISH-Sonden

Name	Herkunft	Vektor	Größe kb	Anti-Sense		Sense		Expositionszeit
				RE	TP	RE	TP	
EBER 1	Dr. Arrand	pBlueKS	0,5	HindIII	T7	EcoRI	T3	Keine
EBER 2	Dr. Arrand	pBlueKS	0,5	BamHI	T3	EcoRI	T7	Keine
vCyc D	Dr. Demel	pTOPO	0,758	XbaI	Sp6	HindIII	T7	4-6 Wochen
vFLIP	Dr. Demel	pTOPO	0,538	XhoI	Sp6	BamHI	T7	4-6 Wochen
vGPCR	Dr. Demel	pTOPO	0,865	XhoI	Sp6	HindIII	T7	4-6 Wochen
vIL-6	Dr. Demel	pTOPO	0,567	XhoI	Sp6	BamHI	T7	4-6 Wochen
vLANA	Dr. Demel	pTOPO	0,579	KpnI	T7	XhoI	Sp6	4-6 Wochen
vMCP1	Dr. Demel	pTOPO	0,964	BamHI	T7	XbaI	Sp6	4-6 Wochen
vMIP-1 α	Dr. Demel	pTOPO	0,252	HindIII	T7	XhoI	Sp6	4-6 Wochen

Abkürzungen: kb: Kilobasen; RE: Restriktionsenzym; TP: Transkriptionspromoter

2.3.1.1 *In vitro* Transkription mit [³⁵S]-UTP

Die *in vitro* Transkription der viralen Sonden erfolgte durch RNA-Polymerasen entsprechend der in den Vektoren vorhandenen Promotersequenzen in Gegenwart von radioaktiv markierten und unmarkierten Nukleotiden. Die dabei entstandenen einzels-trängigen RNA-Sonden waren wahlweise komplementär zum codierenden (*anti-sense*) oder zum nichtcodierenden (*sense*) DNA-Strang.

Die Reaktion wurde in einem Eppendorfröhrchen bei Raumtemperatur durchgeführt. Dabei wurde zu 4,5µl (=50µCi) [³⁵S]-UTP, 2µl 5x Transkriptionspuffer, 0,5µl 100mM DTT, 0,5µl RNAsin, 1,0µl 10mM rNTPs (rATP, rGTP, rCTP), 1µl linearisiertes Plasmid (1µg/µl) und 1µl der entsprechenden RNA Polymerase gemischt. Der Ansatz wurde für 90 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert, wobei nach einer Stunde erneut 0,5µl Polymerase hinzugefügt wurde. Zum Entfernen der DNA-Matrize kamen zum Abschluss 5µl γ-t-RNA, 0,5µl RNAsin und 0,5µl DNaseI hinzu, die Inkubation wurde für weitere 8 min fortgeführt und mit 10µl 3M Na-Acetat gestoppt. Der Ansatz wurde auf 100µl mit 74µl DEPC-H₂O verdünnt. Die Phenol-Extraktion erfolgte mit 100µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) in der Zentrifuge (13000rpm, RT, 5 min). Der Überstand wurde abpipettiert, mit Ethanol (250µl 100%igen Alkohol, 10µl Na-Acetat) bei -70°C über 30 min präzipitiert und anschließend zentrifugiert (13000rpm, 4°C, 20 min). Der Überstand wurde erneut abgegossen und das Pellet in 50µl 10mM DTT gelöst.

2.3.1.2 *In vitro* Transkription mit Digoxigenin

Die *in vitro* Transkription mit Digoxigenin-Markierung der EBER 1 und 2 Sonden erfolgte in einem Eppendorfröhrchen mit 1µl Digoxigenin-rUTP, 4µl Transkriptionspuffer, je 2µl rNTPs (rATP, rGTP und rCTP), 1µl RNAsin, 9µl DEPC-H₂O, 1µl linearisiertes Plasmid und 2µl der entsprechenden Polymerase. Der Ansatz wurde bei 37°C für 90 min im Wasserbad inkubiert, wobei nach 60 min 1µl der RNA Polymerase hinzugefügt wurde. Im Anschluss wurden die Transkripte aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.3.1.3 Alkalische Hydrolyse

Zur besseren Gewebspenetration wurden die RNA-Sonden mit Ausnahme der EBER Sonden durch die alkalische Hydrolyse in kleinere Fragmente (100-150 Nukleotide) zerlegt. Dabei kam zu 50µl Sondenansatz 50µl Hydrolysepuffer, der aus 80mM NaHCO₃, 120mM Na₂CO₃ und 10mM DTT in DEPC-H₂O bestand. Im 60°C heißen Wasserbad wurde die Sonde inkubiert, wobei sich die Dauer nach der Insertlänge der cDNA richtete. Die Formel nach Cox *et al.*¹²⁶, mit der die Hydrolysezeit berechnet wurde, lautet:

$$t = \frac{L_0 - L_f}{k \times L_0 \times L_f}$$

t= Hydrolysezeit, L₀= Anfangslänge des RNA-Transkripts, L_f= Endlänge des RNA-Transkripts (0,15kb), k= 0,11kb⁻¹min⁻¹

Anschließend wurden 100µl Neutralisationspuffer (Stoppuffer) (0,2M NaAc, 1% Essigsäure und 10mM DTT in DEPC-H₂O) zugegeben und sofort mit der Ethanol-Präzipitation (siehe 2.3.1.1) begonnen, in diesem Falle mit 440µl Ethanol und 20µl 3M NaAc. Das Präzipitat wurde mit 0,75ml 70%igen -20°C Ethanol gewaschen, zentrifugiert (13000 rpm, 4°C, 3 min) und der Überstand verworfen. Unter dem Abzug wurde das Eppendorfröhrchen mindestens 10 min getrocknet. Die Resuspendierung erfolgte mit 30µl 10mM DTT, wovon 1µl für die Messung des Einbaus von [³⁵S]-UTP in die Transkripte im Szintillationszähler (Beckman LS1701) abgenommen wurde. Der durchschnittliche Einbau von Aktivität in die RNA-Transkripte betrug 0,8-1,4× 10⁶cpm. Aufgrund der Halbwertszeit des radioaktiven Schwefels von 87,4 Tagen betrug die Haltbarkeit der radioaktiv markierten Transkripte max. 4 Wochen (-80°C).

2.3.2 Einfache radioaktive ISH

2.3.2.1 Behandlung der Paraffinschnitte vor der Hybridisierung

Die 4µm dicken Schnitte wurden auf APES-beschichteten Objektträgern aufgezogen und über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C getrocknet.

Begonnen wurde mit der Entparaffinierung der Schnitte, um das Gewebe für die Ribosomen zugänglich zu machen. Dies erfolgte in Xylol über Nacht. Für 30 min wurden die Schnitte in frischem Xylol auf dem Schüttler entparaffiniert. Die Schnitte kamen kurz in absoluten Alkohol, bevor sie in Aceton, Aceton/1xPBS (1:1)-Gemisch und schließlich in 1xPBS für je 10 min rehydriert wurden. Zur weiteren Permeabilisierung des Gewebes erfolgte die Denaturierung der an die RNA gebundenen basischen Proteine mit 0,2N HCl (20 min), was durch zweimaliges Waschen mit 1xPBS gestoppt wurde. Weitere an die Zielsequenzen gebundene Proteine wurden durch die Pronase-Behandlung (0,125mg/ml Pronase in 1xPBS für 10 min) entfernt. Die Reaktion wurde mit 0,1M Glycin/1xPBS beendet und die Schnitte mit Puffer gewaschen. Um den Verlust von RNA durch Diffusion möglichst gering zu halten, wurden die Schnitte mit 4%igen Paraformaldehyd (in 1xPBS über mindestens 20 min) vor der Hybridisierung fixiert. Gewaschen wurde wieder mit 1xPBS für 3 min. Anschließend wurden positiv geladene Moleküle, wie basische Proteine, durch die Acetylierung (10 min) neutralisiert. Dadurch werden unspezifische Bindungen der Sonde, die ein Hintergrundsignal verursachen, minimiert. Das Essigsäureanhydrid (0,25%) wurde dazu erst direkt vor der Benutzung zum 0,1M Triethanolamin zugegeben. Zum vollständigen Entfernen der Prähybridisierungslösungen wurde erneut gewaschen und dehydriert mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe, die mit DEPC-H₂O angesetzt wurde. Die Schnitte wurden nun in mit Zellstoff ausgelegten Hybridisierungskammern einsortiert und trockneten über 1–2 Stunden.

2.3.2.2 Hybridisierung

Bei der Hybridisierung wurden für jeden Gewebeschnitt 25µl eines Hybridisierungsgemischs mit [³⁵S]-markierter RNA-Sonde (verdünnt auf $1,2 \times 10^6$ cpm/ml Aktivität) verwendet. Das fertige Hybridisierungsgemisch enthielt 50% Formamid (deionisiert), 0,3M NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM NaPO₄, 1x Denhardt's, 1mg/ml γ-t-RNA, 5mM EDTA, 10mM DTT, 10% Dextransulfat und 300.000cpm [³⁵S]-markierter Sonde pro 25µl. Die Sonden wurden zunächst in 50% deionisiertem Formamid, 10mM DTT und DEPC-H₂O für 1 Minute im Wasserbad auf 80°C erhitzt und dann mit 4 Teilen Hybridisierungspuffer gemischt. Das Gemisch aus beiden wurde zentrifugiert (13000rpm, RT, 15 sec) und luftblasenfrei auf die Objektträger verteilt (je 25µl), die mit den gebackenen und silikonisierten Deckgläsern abgedeckt wurden. Der Zellstoff in den Kammern wurde vorsichtig mit einer Lösung aus nicht deionisiertem Formamid und

DEPC-H₂O getränkt. Unter Luftabschluss erfolgte die Hybridisierung im Wärmeschrank (*Heraeus*) bei 48°C für 16-18 Stunden.

2.3.2.3 Posthybridisierungswaschen

Zur Beseitigung lockerer und unspezifisch gebundenen Sonden, die ein unerwünschtes Hintergrundsignal bilden, erfolgten die Waschschrte nach der Hybridisierung unter stringenten Bedingungen, so dass nur (nahezu) perfekt gepaarte Hybride übrig blieben. Hierdurch konnten auch eventuell auftretende Kreuzreaktionen mit humanen Sequenzen unterbunden werden.

Die Schnitte wurden dazu in auf 50°C vorgewärmte Küvetten zusammen mit der ebenfalls auf 50°C erhitzten Posthybridisierungswaschlösung (50% deionisiertes Formamid/ 1x Salze/ 10mM DTT/ 1x Denhardt's) im Schüttelwasserbad (50°C, 30 min) gewaschen. Durch leichtes Rütteln glitten die Deckgläser ab und konnten mit der Waschlösung im radioaktiven Müll entsorgt werden. In neuer Waschlösung erfolgte für weitere 4 Stunden bei 50°C das Waschen. Anschließend wurde für 15 min in 37°C warmer 1x TES-Lösung im 37°C Wasserbad gründlich gewaschen und dann mit RNase A (20µg/ml) in 1x TES bei 37°C für 30 min inkubiert, damit unspezifisch gebundene Sonden entfernt wurden. Die Schnitte mussten wieder gut gewaschen (1x TES, 37°C) und in horizontale Küvetten umsortiert werden. Es erfolgten zwei Waschschrte zur weiteren Entfernung unspezifisch gebundener Sonden bei Raumtemperatur (RT) mit 2x SSC und anschließend 0,1x SSC auf dem Schüttler für je 20 min. In einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 0,3M NH₄-Acetat wurde dehydriert und über Nacht staubfrei getrocknet.

2.3.2.4 Autoradiographie

In der Dunkelkammer wurden bei absoluter Dunkelheit 10ml 0,6M NH₄-Acetat in einer 20ml Plastikkuvette und die Ilford G 5 Fotoemulsion bei 43°C im Wasserbad erwärmt bzw. verflüssigt. 10ml Emulsion wurden mit einer Spritze entnommen und zum NH₄-Acetat gegeben (möglichst luftblasenfrei). Mit einem leeren Objektträger (OT) konnte die fertig gemischte Emulsion auf Luftblasen getestet werden (bei Rotlicht mit geschlossenem Wasserbad) und diese eventuell mit einem Glasstab verrührt werden. Die OT wurden circa 1 sec in die Fotoemulsion getaucht, abgetropft und senkrecht in einen Ständer zum Trocknen gestellt. Die Schnitte trockneten mindestens 1 Stunde, bevor sie in Kartellboxen mit CaCl₂ als Trocknungsmittel einsortiert wurden.

Die Boxen wurden mit Aluminiumfolie lichtdicht verpackt, beschriftet und bei 4°C für die vorgesehene Expositionszeit gelagert.

2.3.2.5 Entwicklung

Zur Entwicklung mussten die Kartellboxen mehrere Stunden an die RT adaptieren. Die Schnitte in den Boxen wurden bei völliger Dunkelheit in Küvetteneinsätze umsortiert und für 3 min in 50%igen Kodak D 19 Entwickler in *Aqua dest.* getaucht. Danach wurde der Entwickler in 1%iger Essigsäure (1 min) inaktiviert. Anschließend wurden die Präparate in 25%igen Fixierer (mit H₂O verdünnt, 3 min) fixiert. Die Küvetteneinsätze wurden während der Entwicklung alle 30 sec leicht gerüttelt. Die Schnitte wurden ca. 30 min unter fließendem Leitungswasser gespült.

2.3.2.6 HE-Färbung für einfache ISH

Die Schnitte wurden mit Hämalaun und Eosin gegengefärbt. Das Hämalaun wurde vorher filtriert. Die Inkubation erfolgt für 3 min, anschließend wurde unter kaltem Leitungswasser überschüssiges Hämalaun entfernt (3-5 min). Dann wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, inkubierten 5-10 sec im Eosin und wurden durch eine absteigende Alkoholreihe rehydriert. Sie wurden mit deionisierten Wasser gewaschen. Mit einer Pasteur Pipette wurde die 45°C warme Glyceringelatine luftblasenfrei auf den Schnitt gebracht, der dann mit einem Deckglas abgedeckt wurde.

2.3.2.7 Kontrollen

Zur Spezifitätskontrolle wurde bei jeder Sonde die dazugehörige [³⁵S]-markierte *sense* Sonde mitgenommen, d.h. bei jedem Fall ein Objektträger mit der *sense* Sonde inkubiert. Hierbei waren maximal einige wenige spezifische Signale zu finden und allenfalls ein leichter über das ganze Präparat verteilter autoradiographischer Hintergrund. Zudem wurden als Negativkontrolle Präparate von HIV-Lymphadenopathien mit untersucht, bei denen keine spezifischen Signale nachweisbar waren. Als spezifisch wurden Signale angesehen, bei denen die Silberkörnchen (*grains*) gruppiert über einer Zelle lagen, die als solche zu erkennen war, und dort akkumulierten. Der Beweis, dass es sich bei den Zielmolekülen tatsächlich um RNA handelte, wurde durch die Vorbehandlung der Schnitte mit *Micrococcus nuclease*, einer RNase, erbracht. Unter diesen Versuchsbedingungen kam es zu einer Reduktion bzw. zum

Verschwinden der spezifischen Signale in den KSHV positiven M.Castleman Präparaten.

2.3.3 Einfache radioaktive ISH mit *Micrococcus nuclease* und DNase I

Bei dieser Methode wurden die Paraffinschnitte vor der Hybridisierung mit *Micrococcus nuclease*, einer RNase, oder DNase I behandelt. So sollte zum einen der Nachweis erbracht werden, dass es sich bei den Zielstrukturen der ISH tatsächlich um RNA handelte, und zum anderen sollte die Spezifität erhöht werden, indem die DNase I störende DNA abbaute, und dadurch der unspezifische autoradiographische Glashintergrund verringert wurde.¹³⁰

2.3.3.1 Vorbehandlung der Paraffinschnitte

Die Vorbehandlung entsprach dem unter Abschnitt 2.3.2.1 angegebenen Protokoll bis zum Schritt der Nachfixierung mit 4%igen PFA/PBS für 15 min. Danach wurden sie in 1xPBS gewaschen. In einer Färbekammer wurden die Schnitte mit der *Micrococcus nuclease*-Lösung (10mM Tris-HCl pH 8,8/1mM CaCl₂/50µg/ml *Micrococcus nuclease*) oder der DNase I-Lösung (50mM Tris-HCl pH 7,5/10mM MgCl₂/100µg/ml DNase I) für 30 min inkubiert. Anschließend wurden sie in einer Waschlösung (10mM Tris-HCl pH 7,5/2mM EDTA) für 10 min gereinigt. Die Acetylierung erfolgte wieder nach dem regulären Protokoll (siehe 2.3.2.1, S.22 ff.), wonach anschließend zweimal mit 2x SSC gespült wurde. In einer aufsteigenden Alkoholreihe wurde dehydriert und danach die Objektträger in einer Hybridisierungskammer getrocknet.

2.3.3.2 Hybridisierung

Die Zusammensetzung des Hybridisierungsgemischs wurde zur Stabilisierung verändert im Vergleich zu dem in Abschnitt 2.3.2.2 angegebenen Konzentrationen. Es enthielt 50% Formamid, 1mM EDTA, 600mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7,5, 2% Dextransulfat, 100µg/ml geschertes Lachssperma, 1mg/ml γ-t-RNA, 20mM DTT, 500.000cpm/OT Sonde und DEPC-H₂O. Auf jeden Schnitt wurden 20µl 50°C Hybridisierungsgemisch pipettiert und für 12-16 Std. bei 50°C inkubiert. Das weitere Vorgehen entsprach dem Protokoll für die einfache radioaktive ISH.

2.3.4 Einfache nicht radioaktive ISH

Die Vorbehandlung der Paraffinschnitte für die nicht radioaktive *in situ* Hybridisierung entsprach der radioaktiven Hybridisierung. Bei der Hybridisierung wurden die gleichen Hybridisierungs- und Sondengemische verwendet (siehe Abschnitt 2.3.2.2, S.23), dabei wurden zusätzlich 0,2µl Sonde/Schnitt von den Digoxigenin-markierten EBER 1 und 2 Sonden benutzt.¹³¹ Auf jeden Objektträger wurden 25µl Hybridisierungsgemisch pipettiert. Die Hybridisierungstemperatur betrug ebenfalls 48°C. Das Posthybridisierungswaschen war bis zum 0,1x SSC Schritt gleich (siehe 2.3.2.3, S.23). Hier schloss sich die Entwicklung an, die im folgenden Abschnitt beschrieben ist.

2.3.4.1 Entwicklung der nicht radioaktiven ISH

Mit immunhistologischen Methoden wurde die spezifisch gebundene Digoxigenin-markierte EBER Sonde nachgewiesen. Zur besseren Haftung des Antikörpers wurde kurz mit 1x TBS/ BSA (0,1g/100ml) gespült. Anschließend wurden die Schnitte für 30 min bei RT mit anti-Digoxigenin inkubiert, das im Verhältnis 1:200 mit 1x RPMI verdünnt war. 5x wurde in 1x TBS gespült, um alle unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen. Zur APAAP-Entwicklung kamen die Schnitte in die Entwicklungslösung (1x E-Puffer, 0,2M Propandiol, Levamisole, Naphtol-AS-Bi-Phosphat, DMF, NaNO₃, Neufuchsin und H₂O) für 10-30 min auf den Schüttler. Danach wurde in 1x TBS gespült und 5 min in 0,1x SSC inkubiert. Die Gegenfärbung erfolgte für 10-20 sec in Hämalan, die Schnitte wurden gewässert und mit Kaisers Glyceringelatine (45°C) eingedeckelt. Die EBER positiven Zellen zeigten ein rotes nukleäres Signal.

2.3.5 Simultane radioaktive und nicht radioaktive ISH

Bei der simultanen Hybridisierung, die sich kaum von den beiden zuvor beschriebenen Protokollen unterscheidet, enthält das Hybridisierungsgemisch gleichzeitig eine radioaktiv markierte und eine nicht radioaktiv markierte Sonde. Zur Detektion der nicht radioaktiv markierten Sonde wurde die Entwicklung wieder nach dem Posthybridisierungswaschen durchgeführt (siehe Abschnitt 2.3.4.1, S.26-27).

2.3.5.1 Vorbehandlung der Paraffinschnitte

Die Vorbehandlung der Schnitte entsprach der einfachen radioaktiven *in situ* Hybridisierung (siehe Abschnitt 2.3.2.1, S.22 ff.).

2.3.5.2 Hybridisierung

Die Hybridisierung wurde mit 25µl Hybridisierungsgemisch pro Objektträger durchgeführt. Das Gemisch enthielt Digoxigenin-markierte EBER 1 und 2 Sonde (0,2µl/Sonde/Schnitt) und 300.000cpm [³⁵S]-markierte Sonde in der regulären Zusammensetzung (50% deionisiertes Formamid, 10% Dextransulfat, 0,3M NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM NaPO₄, 10mM DTT, 5mM EDTA, 1mg/ml Hefe-t RNA, 1xDenhardt's). Die Hybridisierung fand bei 48°C im Heizofen statt (16 Stunden).

2.3.5.3 Posthybridisierungswaschen

Das Waschen fand unter den gleichen Bedingungen wie bei der einfachen radioaktiven ISH statt (siehe Abschnitt 2.3.2.3, S.23), wobei sich nach dem 0,1x SSC Schritt die Detektion der Digoxigenin-markierten Sonde anschloss (siehe Abschnitt 2.3.4.1, S.26-27). Zur Vorbereitung auf die Autoradiographie wurden die Schnitte nach dem letzten 0,1x SSC Schritt in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 70%, 90% und 100% Ethanol mit 0,3M NH₄-Acetat) schnell dehydriert, da das Färbungsprodukt der APAAP-Entwicklung alkohollöslich ist. Danach wurden die Schnitte staubfrei getrocknet und mit Fotoemulsion zur Autoradiographie beschichtet. Die Entwicklung fand nach der gestaffelten Expositionszeit in der gewohnten Weise statt (siehe Abschnitt 2.3.2.5, S.24). Die Gegenfärbung ist in Abschnitt 2.3.4.1 (S.26-27) beschrieben.

2.4 Immunhistologie (IH)

Mit der Immunhistologie können immunphänotypische Marker von Zellen mittels monoklonaler Antikörper, die spezifisch an Antigenepitope gebunden sind, nachgewiesen werden. Durch die Kombination von ISH und IH bzw. zwei verschiedener immunhistologischer Methoden konnte in der vorliegenden Arbeit eine Phänotypisierung der KSHV positiven Zellen stattfinden.

2.4.1 Sequentielle APAAP-IH und radioaktive ISH

Für die Kombination der IH mit der ISH wurde eine Modifikation der Protokolle nach Höfler *et al.* notwendig.¹³² Der immunhistologische Nachweis erfolgte nach der APAAP (Alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase) Methode.^{133,134} Die

Immunhistologie wurde unter RNase-freien Bedingungen vor der ISH durchgeführt. Die Spezifität und Herkunft der Antikörper ist in Tabelle 3 (S.30) aufgeführt.

Die Schnitte wurden zunächst gründlich in Xylol entparaffiniert und dann rehydriert (je 10 min in Aceton, Aceton/1xPBS, 1xPBS und 1xPBS/1xTBS). Dem folgte eine Denaturierung der Proteine mit Pronase (0,125mg/ml) bei 37°C für 10 min. Mit TBS wurde 5 min gespült, bevor die unten aufgeführten Inkubationsschritte, zwischen denen jeweils mit TBS gespült wurde, durchgeführt wurden. Die Schritte dauerten je 30 min.

APAAP- Methode

1. Primärer monoklonaler Antikörper verdünnt mit RPMI/Hefe (50mg/ml)
2. Kaninchen anti-Maus Brückenantikörper verdünnt 1:20 mit RPMI/Hefe/Humanserum
3. APAAP-Komplex verdünnt 1:20 mit RPMI/Hefe
4. Wiederholung der Schritte 2. und 3. für jeweils 10 min

Die Entwicklung (siehe 2.3.4.1, S.26-27) folgte nun für 20 min, wonach mit 1xPBS gespült wurde. Die Schnitte wurden 10 min mit Paraformaldehyd/PBS nachfixiert, mit PBS gespült und zur Denaturierung der basischen Proteine 20 min in 0,2N HCl inkubiert. Danach wurde nach dem ISH Protokoll (siehe Abschnitte 2.3.2.1 und folgende) weitergearbeitet unter Auslassung des Pronase Schrittes, um einen übermäßigen Verdau zu vermeiden. Die Alkoholreihen wurden so kurz wie möglich gehalten wegen der Alkohollöslichkeit des APAAP-Färbeprodukts.

2.4.2 Sequentielle Peroxidase-IH und radioaktive ISH

Diese IH wurde mit dem „Enhanced Peroxidase One-Step Staining“ System (EPOS-System, DAKO) ausgeführt. Die verwendeten Antikörper mit ihrer Spezifität sind in Tabelle 3 (S.30) aufgelistet.

Die Paraffinschnitte wurden in Xylol entparaffiniert und wurden in Aceton, Aceton/PBS und PBS (je 5 min) rehydriert. Anschließend folgte eine 10minütige Blockade der gewebseigenen Peroxidase mit 3% H₂O₂/PBS. Die Schnitte wurden mit PBS gespült. Je nach Antikörper folgte nun eine Denaturierung mit Pronase (0,125mg/ml)/PBS über 10 min. Die Reaktion wurde durch Spülen mit PBS und danach TBS unterbrochen. Die Schnitte inkubierten 1 Stunde unter Lichtabschluss bei

RT in einer feuchten Kammer mit dem Antikörper. Anschließend wurde 5 min mit TBS gespült, bevor die Schnitte 10 min lang bei RT mit Diaminobenzidin (DAB) gelöst in DEPC-H₂O entwickelt wurden. Es wurde mit TBS und PBS gespült und mit der Denaturierung mit 0,2N HCl über 10 min begonnen. Das weitere Procedere verlief nach dem Protokoll für die einfache radioaktive ISH.

2.4.3 Sequentielle Peroxidase- und APAAP-IH

Bei dieser sequentiellen IH wurden nacheinander eine Peroxidase-IH und eine APAAP-IH mit dem KSHV-Antikörper LN53, der gegen vLANA gerichtet ist, ausgeführt. Der Antikörper wurde freundlicherweise von Professor M.D. Peter G. Isaacson (London) zur Verfügung gestellt.

Die Schnitte wurden mit Xylol entparaffiniert, mit Aceton und Aceton/1xTBS rehydriert und Antikörper-spezifisch vorbehandelt (siehe Tabelle 3, S.30), bevor die Peroxidase-IH begonnen wurde. Die Schnitte inkubierten 30 min mit dem Antikörper, um dann mit einem Detection Kit (Detection Kit K5001, Peroxidase/DAB, DAKO) für die DAB-Entwicklung (siehe Abschnitt 2.4.2) vorbereitet zu werden. Im Anschluss wurde mit 1x TBS pH 7,6 gespült. Danach wurde die APAAP-IH durchgeführt, wobei die Schnitte wieder für den AK spezifisch vorbereitet wurden. Der Antikörper wirkte eine Stunde im Gewebe ein. Die Gegenfärbung erfolgte ausschließlich mit Hämalaun, anschließend wurden die Präparate mit Deckgläsern abgedeckt.

Tabelle 3: Antikörper für die Immunhistologie

Antikörper	Herkunft	Spezifität	Verdünnung	Vorbehandlung
CD 3	EPOS, Dako	T-Zellen	Unverdünnt	10'B, 10'P
CD 10	Immunotech	Keimzentrums-B-Zellen	1:25	2'K, 10'B
CD 20	Dako	B-Zellen	1:100	2'K, 10'B
CD 23	Novocastra	Aktivierte B-Z., FDC	1:20	2'K, 10'B
CD 38	Novocastra	Aktivierte B-Z., PZ	1:50	2'K, 10'B
Ig A	Dako	Ig A (B-Zellen)	1:20000	10'P, 40'B
Ig D	Dako	Ig D (B-Zellen)	1:200	2'K,40'B,AK ün
Ig G	Sigma	Ig G (B-Zellen)	1:4000	2'K,40'B,AK ün
Ig M	Dako	Ig M (B-Zellen)	1:400	2'K,40'B,AK ün
JCB117 (CD79a)	Dako	B-Zellen	1:50	
JC70A (CD31)	Dako	Endothelzellen	1:25	10'P
J-Kette	BioGenex	B-Zellen	1:20	
κ -light chains	EPOS, Dako	κ -Kette (B-Z., PZ)	Unverdünnt	
κ -light chains	BioGenex	κ -Kette (B-Z., PZ)	1:1000	5'K,40'B,AK ün
λ -light chains	EPOS, Dako	λ -Kette (B-Z., PZ)	Unverdünnt	
λ -light chains	BioGenex	λ -Kette (B-Z., PZ)	1:1000	5'K,40'B,AK ün
L26 (CD 20)	EPOS, Dako	CD 20 (B-Zellen)	Unverdünnt	5'B
KSHV(LN 53)	Prof. M.D. Peter G. Isaacson ¹	vLANA (Protein des KSHV)	1:1000	5'Puffer pH9,9, Ratte,AK1h, 1Wdh
MUM1 (IRF4)	Dako	Keimzentrum-B-Z., PZ	1:10	
Syndecan1 (CD138)	Serotech	Plasmazellen	1:10	2'K, 10'B
VS 38c	Dako	Plasmazellen	1:100	

¹ Department of Histopathology, Royal Free and University College Medical School, London, Grossbritannien

Abkürzungen: B: Blockade mit 3% H₂O₂; K: Kochen; P: Pronase (25mg/50ml); AK: Antikörper; ün: über Nacht; B-Z.: B-Zellen; FDC: folliculäre dendritische Zellen; PZ: Plasmazellen

2.5 Auswertungskriterien

Die Anzahl der spezifisch markierten Zellen in den immunhistologischen Färbungen und den *in situ* Hybridisierungen wurde an einem Lichtmikroskop ausgezählt. Es wurden mindestens zehn konsekutive Felder bei 400facher Vergrößerung (Zeiss Planobjektive 40fach und Zeiss Okular 10fach) ausgewertet. Pro Objektträger wurden so 300 ISH- bzw. IH-positive Zellen ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 KSHV Screening mittels PCR

Zum initialen Screening der M. Castleman Fälle auf das Vorliegen einer KSHV Infektion wurde eine PCR durchgeführt. Als Positivkontrollen kamen 13 Kaposi Sarkome (KS) zum Einsatz, die zu 100% positiv für das Virus waren. Der Negativkontrolle dienten 10 Lymphadenektomiepräparate bei HIV-Lymphadenopathie, 2 Lymphome, 7 Tonsillektomien bei chronischer Tonsillitis, 5 Schleimhaut-Probeexzisionen (PE) bei chronischer Sinusitis, 1 NNH-Papillom und 2 PEs bei chronisch gastrointestinalen Erkrankungen (siehe Tabellen 4 und 5, S.32-34). Bei keiner der insgesamt 27 Fälle dieser 7 Erkrankungen ließ sich das Virus nachweisen.

Im Anschluss wurden 45 Proben von 43 Patienten mit M. Castleman mit der PCR auf das Vorhandensein des KSHV untersucht. Bei zwei Patienten wurden je zwei MC Proben im Verlauf der Erkrankung analysiert (Nr. C6a und b, Nr. C20a und b, siehe Tabelle 6, S.34-36). Der Anteil der einzelnen M. Castleman-Typen war wie folgt verteilt:

- | | |
|--|-----------|
| 1. <u>Hyalin-vaskulärer M. Castleman</u> | 13 Proben |
| 2. <u>Plasmazellreicher M. Castleman</u> | 11 Proben |
| 3. <u>Gemischter M. Castleman</u> | 21 Proben |

Sieben Proben von 6 der 43 MC Patienten waren KSHV positiv (14 % der untersuchten M. Castleman Fälle), darunter 2 mit der Diagnose eines plasmazellreichen und 5 mit der Diagnose eines gemischten M. Castleman, d.h. mit histologischen Merkmalen sowohl eines hyalin-vaskulären als auch eines plasmazellreichen MC. Diese KSHV positiven MC wurden im Folgenden weiter mittels ISH und IH auf das Genexpressionsmuster und den Phänotyp der infizierten Zellen untersucht.

Tabelle 4: Kaposi-Sarkome, Papillom, chronische Tonsillitiden und Sinusitiden für die PCR

Fall-Nr.	HIV-Status, Diagnose (Lokalisation)	KSHV
KS 1	HIV+, ulzeriertes KS (Gaumen)	Positiv
KS 2	HIV+, ulzeriertes KS (Kiefer)	Positiv
KS 3	HIV+, KS (Mundhöhle)	Positiv
KS 4	HIV-, KS (Haut & Mundhöhle)	Positiv

Fortsetzung Tabelle 4: Kaposi Sarkome, Papillom, chronische Tonsillitiden und Sinusitiden für die PCR

KS 5	HIV+, KS (Magen-Darm-Trakt)	Positiv
KS 6	HIV+, KS (Gaumen)	Positiv
KS 7	HIV+, KS (Haut & Gaumen)	Positiv
KS 8	HIV+, KS (Zunge)	Positiv
KS 9	HIV+, KS (Mund)	Positiv
KS 10	HIV+, KS, klinisch zudem M. Castleman*	Positiv
KS 11	HIV+, KS, klinisch zudem PEL-ähnliche Veränderung*	Positiv
KS 12	HIV+, KS (LK, Zunge, Lunge, Leber, M-D-T)	Positiv
KS 13	HIV+, KS	Positiv
T 1	HIV-, chronische Tonsillitis	Negativ
T 2	HIV-, chronische Tonsillitis	Negativ
T 3	HIV-, chronische Tonsillitis	Negativ
T 4	HIV-, chronische Tonsillitis	Negativ
T 5	HIV-, chronische Tonsillitis	Negativ
T 6	HIV-, chronische Tonsillitis	Negativ
T 7	HIV-, chronische Tonsillitis	Negativ
P 1	HIV-, NNH-Papillom	Negativ
S 1	HIV-, chronische Sinusitis	Negativ
S 2	HIV-, chronische Sinusitis	Negativ
S 3	HIV-, chronische Sinusitis	Negativ
S 4	HIV-, chronische Sinusitis	Negativ
S 5	HIV-, chronische Sinusitis	Negativ

Abkürzungen: KS: Kaposi Sarkom; HIV: *human immunodeficiency virus*; LK: Lymphknoten; PEL: *primary effusion lymphoma*; M-D-T: Magen-Darm-Trakt; NNH: Nasennebenhöhlen; * im Präparat nicht nachweisbar

Tabelle 5: HIV-Lymphadenopathien, Lymphome und gastrointestinale Erkrankungen für PCR und ISH

Fall-Nr.	HIV-Status, Diagnose	KSHV
LA 1	HIV+, HIV-LA	Negativ
LA 2	HIV+, HIV-LA	Negativ
LA 3	HIV+, HIV-LA	Negativ
LA 4	HIV+, HIV-LA	Negativ
LA 5	HIV+, HIV-LA, klinisch zudem diff. anapl. großzell. B-Zell Lymphom*, EBV+	Negativ
LA 6	HIV+, HIV-LA	Negativ
LA 7	HIV+, HIV-LA	Negativ
LA 8	HIV+, HIV-LA	Negativ
LA 9	HIV+, HIV-LA, klinisch zudem KS*	Negativ
LA 10	HIV+, HIV-LA	Negativ
L 1	NB, Follikelzentrumslymphom	Negativ
L 2	HIV+, EBV-induzierte Lymphoproliferation	Negativ
G 1	NB, hyperplastischer Colon-Polyp	Negativ
G 2	NB, chronische Gastritis	Negativ

Abkürzungen: HIV: *human immunodeficiency virus*; LA: Lymphadenopathie; diff. anapl. großzell.: diffus anaplastisches großzelliges; EBV: Epstein-Barr Virus; KS: Kaposi Sarkom; NB: nicht bekannt; * im Präparat nicht nachweisbar

Tabelle 6: M. Castleman-Kollektiv für PCR und ISH

Fall-Nr.	HIV-Status, Diagnose	KSHV
C 1	HIV+, M. Castleman m. Plasmozytose	Positiv
C 2	HIV+, gemischter M. Castleman	Positiv
C 3	HIV+, plasmazellreicher M. Castleman, klinisch zudem KS (LK)*	Positiv
C 4	HIV+, hyalin-vaskulärer M. Castleman mit Plasmozytose	Positiv
C 5	NB, M. Castleman	Positiv

Fortsetzung Tabelle 6: M. Castleman-Kollektiv für PCR und ISH

C 6a	HIV+, M. Castleman-ähnliche Veränderung	Positiv
C 6b	HIV+, plasmazellreicher M. Castleman	Positiv
C 7	NB, hyalin-vaskulärer M. Castleman	Negativ
C 8	NB, hyalin-vaskulärer M. Castleman	Negativ
C 9	HIV+, hyalin-vaskulärer M. Castleman	Negativ
C 10	NB, plasmazellreicher M. Castleman	Negativ
C 11	NB, gemischter M. Castleman	Negativ
C 12	NB, hyalin-vaskulärer M. Castleman	Negativ
C 13	NB, multizentrischer, plasmazellreicher M. Castleman	Negativ
C 14	NB, plasmazellreicher M. Castleman	Negativ
C 15	NB, hyalin-vaskulärer M. Castleman	Negativ
C 16	NB, plasmazellreicher M. Castleman	Negativ
C 17	NB, hyalin-vaskulärer M. Castleman	Negativ
C 18	NB, gemischter M. Castleman	Negativ
C 19	NB, hyalin-vaskulärer M. Castleman	Negativ
C 20a	NB, M. Castleman ähnliche Veränderung	Negativ
C 20b	NB, hyalin-vaskulärer M. Castleman	Negativ
C 21	NB, M. Castleman ähnlich, monoklonale Plasmozytose	Negativ
C 22	NB, gemischter M. Castleman	Negativ
C 23	NB, hyalin-vaskulärer M. Castleman	Negativ
C 24	NB, plasmazellreicher M. Castleman	Negativ
C 25	NB, M. Castleman	Negativ
C 26	NB, hyalin-vaskulärer M. Castleman	Negativ
C 27	NB, plasmazellreicher M. Castleman	Negativ
C 28	NB, M. Castleman ähnliche Veränderung	Negativ
C 29	NB, M. Castleman ähnliche Veränderung	Negativ
C 30	NB, M. Castleman ähnliche Veränderung	Negativ
C 31	NB, plasmazellreicher M. Castleman	Negativ

Fortsetzung Tabelle 6: M. Castleman-Kollektiv für PCR und ISH

C 32	NB, M. Castleman ähnliche Veränderung	Negativ
C 33	NB, M. Castleman	Negativ
C 34	NB, M. Castleman ähnliche Veränderung	Negativ
C 35	NB, M.Castleman m. polyklonaler Plasmozytose	Negativ
C 36	NB, M. Castleman ähnliche Veränderung	Negativ
C 37	NB, hyalin-vaskulärer M. Castleman	Negativ
C 38	NB, gemischter M. Castleman	Negativ
C 39	NB, plasmazellreicher M. Castleman	Negativ
C 40	NB, plasmazellreicher M. Castleman	Negativ
C 41	NB, hyalin-vaskulärer M. Castleman	Negativ
C 42	NB, M. Castleman ähnliche Veränderung	Negativ
C 43	NB, hyalin-vaskulärer M. Castleman	Negativ

Abkürzungen: HIV: *human immunodeficiency virus*; KS: Kaposi Sarkom; LK: Lymphknoten; NB: nicht bekannt; LA: Lymphadenopathie; * im Präparat nicht nachweisbar.

3.2 Genexpressionsmuster und Lokalisation der KSHV positiven Zellen

Um das Genexpressionsmuster der KSHV infizierten Zellen und deren Lokalisation innerhalb der untersuchten Lymphknoten zu charakterisieren, wurde eine ISH mit den für das KSHV spezifischen RNA-Sonden vCyclin D1, vFLIP, vGPCR, vIL-6, vLANA, vMCP1 und vMIP-1 α durchgeführt (Abbildung 1a-f, S.40-41). Die dabei entstandenen spezifischen autoradiographischen Signale variierten in der Anzahl und Stärke sowohl in Bezug auf die eingesetzte *anti-sense* bzw. *sense* Sonde als auch innerhalb der Fälle.

Grundsätzlich zeigte sich, dass überwiegend Zellen im Follikelmantel infiziert waren und nur vereinzelt Zellen im interfollikulären Raum. Selten fanden sich infizierte Zellen in den Keimzentren. Morphologisch sind viele dieser Zellen Blasten zuzuordnen (mittelgroße Zellen mit einem großen zentralen oder randständigem Nukleus und bis zu drei Nukleoli).

Die als Negativkontrollen mitgeführten HIV-Lymphadenopathien waren sowohl für die *sense* als auch die *anti-sense*-Sonden negativ.

1. Transkripte mit häufiger Expression

Besonders häufig und mit intensiven Signalen exprimiert wurden die Transkripte von vCyclin D1, vFLIP, vLANA und vIL-6 (Abbildung 1a-d, S.40). Bei diesen Genen wiesen durchschnittlich 30-50(-100) Zellen in einem Follikelmantel Transkripte auf - unabhängig von dem untersuchten Fall.

In der Interfollikulärzone (IFZ) waren kaum Transkripte nachzuweisen. Es zeigten sich aber Unterschiede zwischen den Sonden. Virales LANA wurde dort verhältnismäßig häufig in Nestern aus 4-8 infizierten Zellen ausgeprägt. Virales Cyclin D1 und vFLIP waren vereinzelt in der IFZ nachweisbar, vIL-6 kaum. Die Keimzentren zeigten bei allen vier Transkripten nur einige wenige positive Zellen.

Die autoradiographischen Signale waren bei diesen Sonden sehr stark ausgeprägt. Vor allem vCyclin D1 lieferte zum Teil so intensive Signale, dass die Zelle nicht mehr zu erkennen war. Somit waren die Signale teilweise nicht auswertbar.

2. Transkripte mit geringer Expression

Vergleichsweise wenige und auch schwächere Signale fanden sich bei vGPCR, vMCP1 und vMIP-1 α mit 5-20 exprimierenden Zellen pro Follikelmantel (Abbildung

1e-g, S.40-41). Die infizierten Zellen verteilten sich homogener über die verschiedenen Kompartimente (MZ, IFZ und Keimzentrum). Vor allem vGPCR wurde in allen drei Kompartimenten exprimiert mit einer allenfalls geringen Betonung der Mantelzone.

Auffällig war, dass vMIP-1 α sehr variabel in den einzelnen Fällen exprimiert wurde. Sehr wenige spezifische Signale wurden im Fall C1 ausgebildet, sehr viele dagegen in den Fällen C2 und C3.

Die zur Spezifitätskontrolle mitgeführten *sense* RNA-Sonden wiesen größtenteils einige wenige (ca.10/Schnitt) spezifische Signale auf. Üblicherweise sind jedoch bei den *sense* Ribosonden keine spezifischen Signale zu sehen. Die Signale waren zu meist schwächer ausgeprägt als bei den *anti-sense* RNA-Sonden und sie waren interessanterweise in ihrer Verteilung auf einige wenige Follikel beschränkt (Abbildung 1h, S.41). Die markierten Zellen fanden sich wieder überwiegend in den Mantelzonen aber auch in der IFZ.

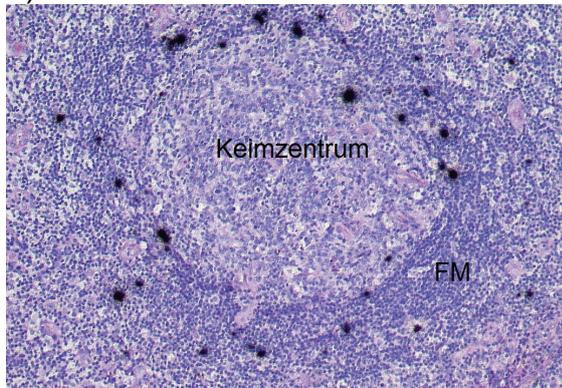
Um zu klären, ob es sich bei den nachgewiesenen Zielstrukturen bei den *anti-sense*- und *sense*-Hybridisierungen um RNA oder DNA handelt, wurden einige Schnitte von Fällen mit starker Expression der Transkripte vCyclin, vMIP-1 α und vMCP vor der ISH mit *Micrococcus nuclease*, einer RNase, oder mit DNase I vorbehandelt. Als Positivkontrolle diente IP 10, eine bekannte RNA-Sonde, und als Negativkontrolle ein (KSHV negatives) Lymphom.

Die DNase I-Behandlung führte zu einer Reduktion des Hintergrundsignals, und zum anderen unerwarteterweise zu einer Zunahme der Anzahl der spezifischen Signale bei *anti-sense* und *sense*-Hybridisierungen der KSHV-Ribosonden, jedoch nicht der IP 10-Sonde (ohne Abbildung).

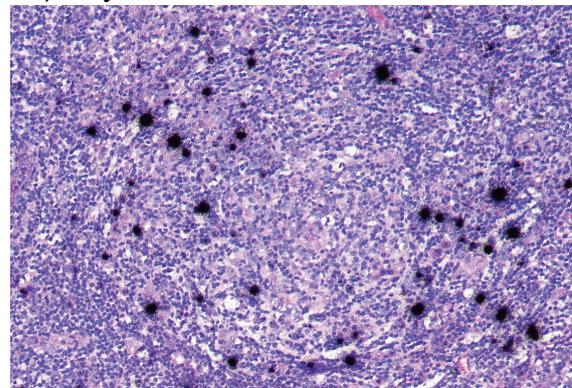
Im Gegensatz hierzu konnte man bei der *Micrococcus nuclease* Behandlung eine deutliche Reduktion der Anzahl und der Intensität der Signale bei vCyclin und vMCP (*anti-sense* Sonde) beobachten. Bei den Sonden vMIP-1 α und IP 10 traten nach der Behandlung gar keine spezifischen Signale mehr auf. Die bei den *sense* RNA-Sonden der KSHV Proben aufgetretenen spezifischen Signale waren nicht mehr nachweisbar bzw. in ihrer Anzahl deutlich reduziert nach der RNase-Behandlung (Abbildung 2a, b, S.41).

Abbildung 1: KSHV Genexpressionsmuster beim M. Castleman

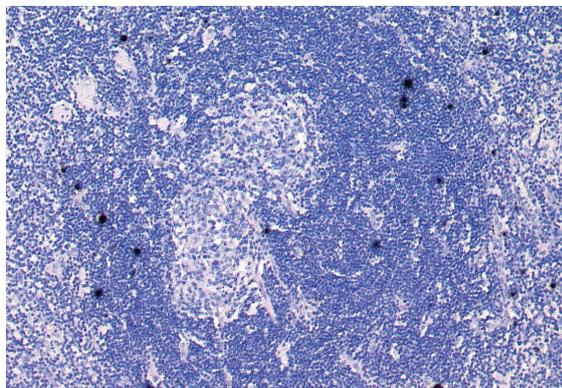
a) vIL-6



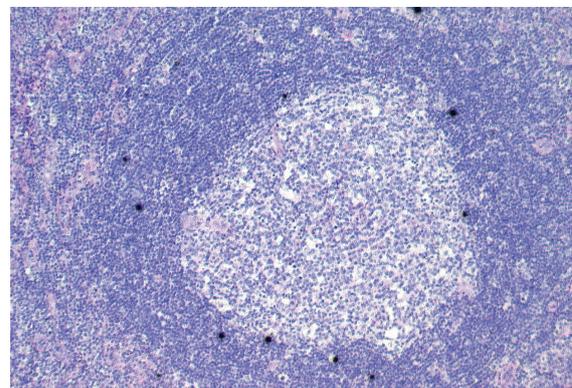
b) vCyclin



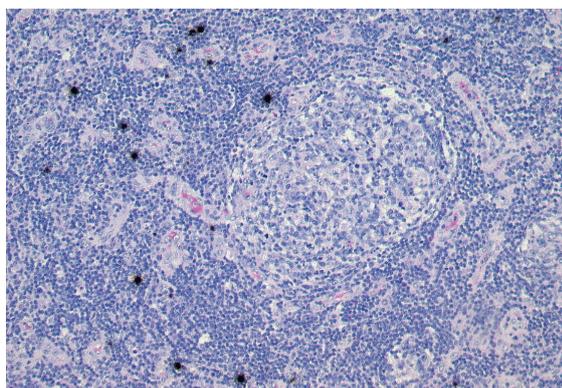
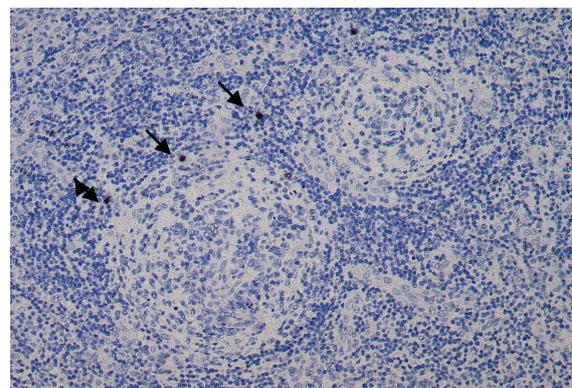
c) vFLIP



d) vLANA

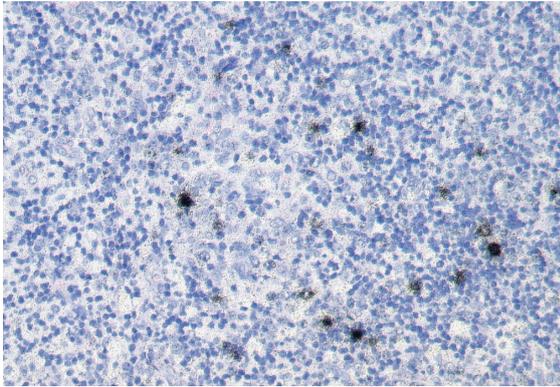


e) vGPCR

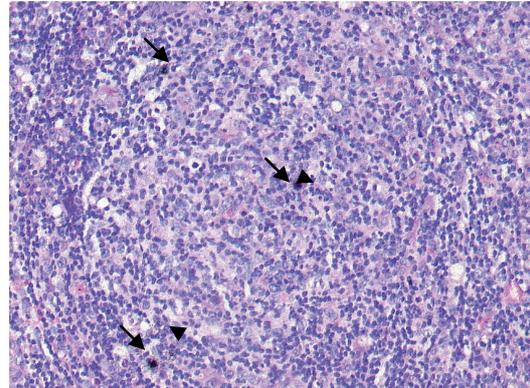
f) vMIP-1 α 

einfache radioaktive in situ Hybridisierung: a)-f) unterschiedlich starke Expression von vIL-6, vCyclin, vFLIP, vLANA, vGPCR und vMIP überwiegend in den Follikelmänteln (FM) (*anti-sense* Sonden)
(Vergrößerungen: 45x, 36.5x, 25x, 25x, 30.5x, 34.5x)

g) vMCP



h) vCyclin

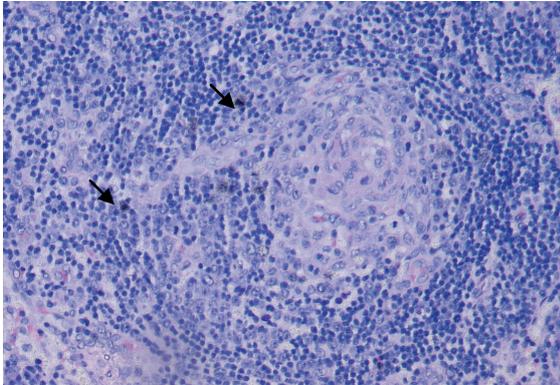


einfache radioaktive in situ Hybridisierung: g) Expression von vMCP im Follikelmantel eines M. Castleman (*anti-sense* Sonde) h) einzelne spezifisch markierte Zellen im FM und Keimzentrum mit der vCyclin *sense* Sonde (Pfeile)

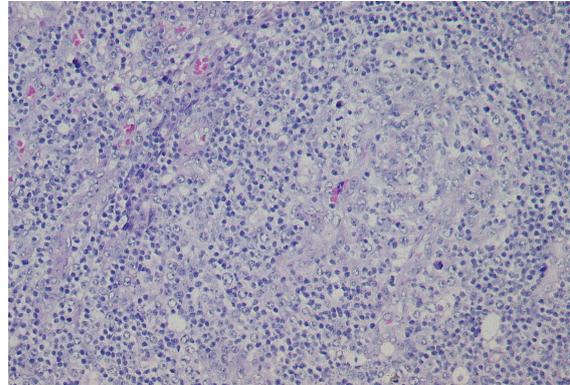
(Vergrößerungen: 49.5x, 40.5x)

Abbildung 2: Micrococcus nuclease-Behandlung, radioaktive ISH

a) vCyclin *anti-sense* mit Micrococcus nuclease



b) vCyclin *sense* mit Micrococcus nuclease



a) einzelne spezifische Signale der vCyclin *anti-sense* Sonde im FM nach Micrococcus nuclease-Behandlung b) kein Nachweis spezifischer Markierungen der vCyclin *sense* Sonde nach Micrococcus nuclease-Behandlung

(Vergrößerungen: 47x, 50x)

3.3 Phänotypisierung der KSHV positiven Zellen

Der Phänotyp der KSHV positiven Zellen bei den sieben KSHV-assoziierten Proben eines Morbus Castleman wurde zum einen durch die Kombination von Immunhistologie und *in situ* Hybridisierung und zum anderen durch immunhistologische Doppelmarkierungen ermittelt. Für die Kombination von IH und ISH wurden die Sonden vCyclin, vGPCR und vIL-6 verwendet, da sie die stärksten Signale produzierten. Bei den immunhistologischen Doppelmarkierungen kam ein Antikörper gegen vLANA (LN53) zum Einsatz.

Dabei zeigte sich, dass die KSHV positiven Zellen vor allem B-Zell- und Plasmazellmarker exprimierten (Tabellen 7 und 8, S.43). Die überwiegende Zahl der Zellen war positiv für die B-Zell-Marker J-Kette und MUM1, die von plasmazellulär differenzierten Zellen exprimiert werden. Die Marker konnten in 91% (J-Kette) und 94% (MUM1) zusammen mit vCyclin nachgewiesen werden (Abbildung 3a, b, S.44). Es zeigte sich mittels immunhistologischer Doppelmarkierung in den KSHV positiven Zellen eine Produktion von IgM (99%) mit einer λ -leicht Ketten Restriktion (94,5%) (Abbildung 3c,d, S.44). Dementsprechend lagen keine oder kaum mit IgG, IgD oder κ -leicht Ketten doppelmarkierten Zellen vor (ohne Abbildung). Fast alle (96%) KSHV positiven Zellen waren ebenfalls positiv für CD38, ein Plasmazell- und Aktivierungsmarker der B-Zellen (Abbildung 3e, S.45). Der pan-B-Zell-Marker CD20 wurde nur von wenigen infizierten Zellen exprimiert: zusammen mit vGPCR 1,3%, mit vCyclin 0,86% und mit vIL-6 1,6% (Abbildung 3f, S.45).

Der Plasmazellmarker VS38c (2,6%) (ohne Abb.) und pan-B-Zell-Marker JCB117 (CD79a) (3,5%) wurden nur von wenigen KSHV positiven Zellen ausgeprägt (Abbildung 3g, S.45). Auch andere Marker wie das CD10 für (u.a.) Keimzentrums-B-Zellen, CD23 als Marker für Follikelmantelzellen und follikuläre dendritische Zellen und das Syndecan (CD138) für Plasmazellen waren überwiegend negativ (Abbildung 3h-j, S.46).

Nur sehr wenige KSHV positive Zellen exprimierten den T-Zell-Marker CD3: vGPCR (0%), vCyclin (0,7%) und vIL-6 (0,6%) (ohne Abb.).

Endothelmarker wie das JC70A (CD31) konnten nicht zusammen mit vCyclin (0%) lokalisiert werden (ohne Abb.).

Tabelle 7: Phänotyp der KSHV positiven Zellen, ISH/IH

Nr. / Sonde / Antikörper	Fall- C 1	C 2	C 3	C 4	C 6a
vCyclin/CD3	0 %	0 %	1,67 %	0 %	1,3 %
vCyclin/CD20	0 %	0,67 %	0 %	0 %	3 %
vCyclin/JC70A	0 %	ND	ND	ND	0 %
vCyclin/JCB117	2 %	ND	ND	ND	5,67 %
vCyclin/J-Kette	90,67 %	ND	ND	ND	92 %
vCyclin/MUM1	94 %	ND	ND	ND	95 %
vCyclin/VS38c	1,67 %	ND	ND	ND	0,3 %
vGPCR/CD3	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
vGPCR/CD20	0,86 %	NA	1 %	4,4 %	1 %
vIL-6/CD3	0 %	0 %	0,67 %	0 %	2 %
vIL-6/CD20	1,3 %	0 %	0,67 %	5,95 %	3,3 %

Abkürzungen: ND: nicht durchgeführt; NA: nicht auswertbar

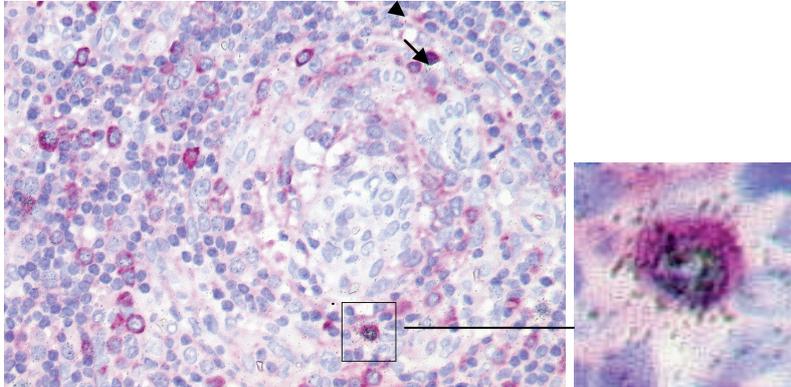
Tabelle 8: Phänotyp der KSHV infizierten Zellen bei den M. Castleman Fällen C 1 und C 6a (immunhistologische Doppelmarkierung)

Antikörper	Fall-Nr. C 1	C 6a
CD10/LN53	1%	0,7%
CD20/LN53	1,3%	7,3%
CD23/LN53	8,7%	6,7%
CD38/LN53	100%	92%
IgA/LN53	NA	NA
IgD/LN53	0%	0%
IgG/LN53	0,7%	0,3%
IgM/LN53	100%	98,7%
κ/LN53	4%	1%
λ/LN53	95,7%	93,3%
Syndecan/LN53	7%	0,3%

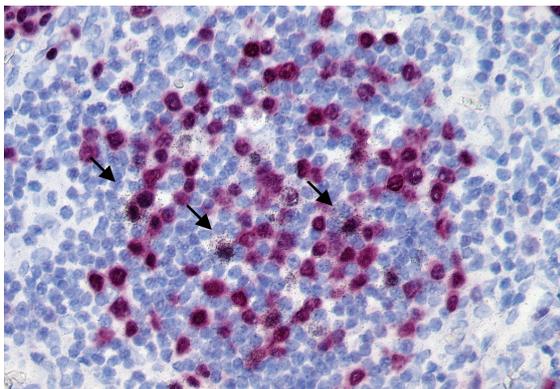
Abkürzungen: LN53: Antikörper gegen das virale *latency associated nuclear antigen* (vLANA); NA: nicht auswertbar; κ: kappa leicht Ketten; λ: lamda leicht Ketten

Abbildung 3: Phänotypisierung der KSHV positiven Zellen, Kombination Immunhistologie und in situ Hybridisierung und Doppelmarkierung Immunhistologie

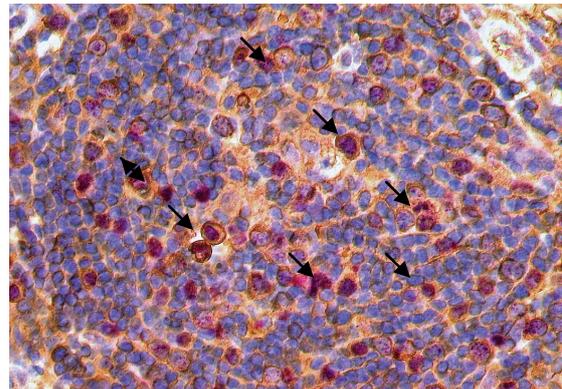
a) J-Kette/vCyclin



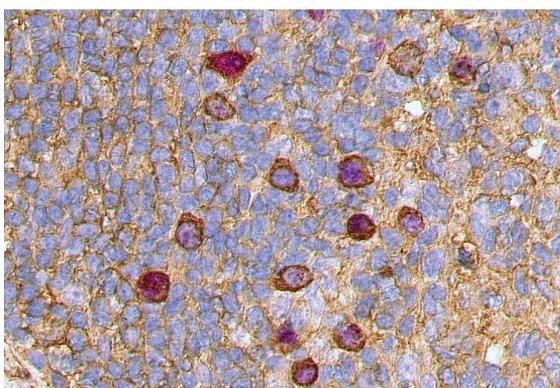
b) MUM1/vCyclin



c) IgM/LN53



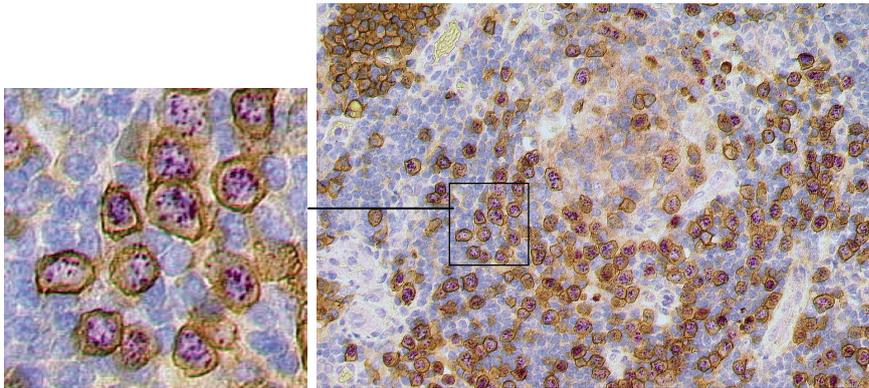
d) λ -leicht Ketten/LN53



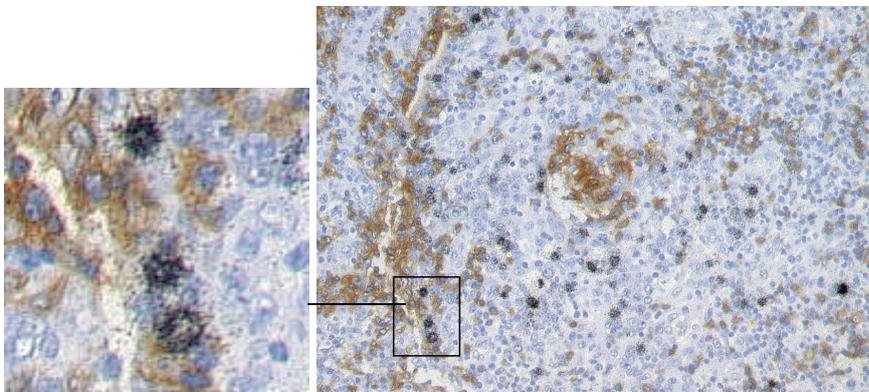
radioaktive ISH und IH: a) und b) simultane Expression von J-Kette (rotes zytoplasmatisches Signal) und vCyclin (schwarze Körnung) (Pfeil und Insert) bzw. MUM1 (rotes nukleäres Signal) und vCyclin (schwarze Körnung) (Pfeile); IH-Doppelmarkierung: c) und d) fast 100%ige Koexpression von IgM (Pfeile) bzw. λ -leicht Ketten (jeweils braune zytoplasmatische Signale) und LN53 (rote, gepunktete nukleäre Signale)

(Vergrößerungen: 100x, 1000x, 100x, 90x, 150x)

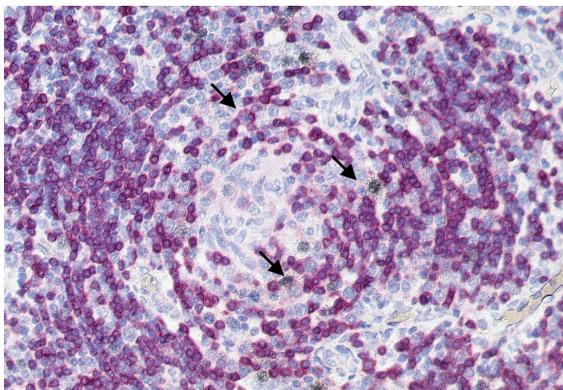
e) CD38/LN53



f) CD20/vIL-6

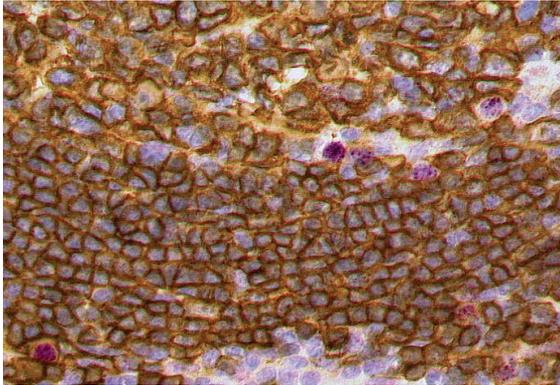


g) JCB117/vCyclin

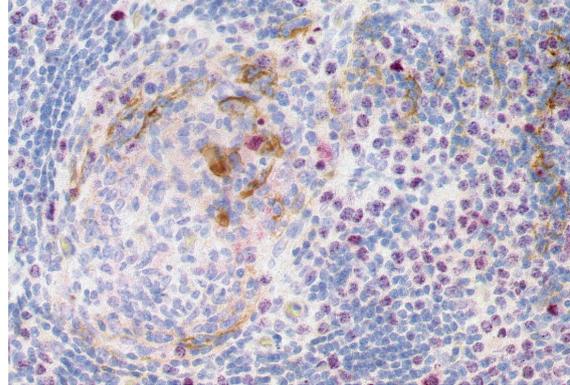


IH-Doppelmarkierung: e) 100%ige Koexpression von CD38 (braune zytoplasmatische Signale) und LN53 (rote, gepunktete nukleäre Signale); radioaktive ISH und IH: f) und g) sehr wenige bis keine Doppelmarkierung (Pfeile) von CD20 (braune zytoplasmatische Signale) und vIL-6 (schwarze Körnung) bzw. JCB117 (rote zytoplasmatische Signale) mit vCyclin (schwarze Körnung)
(Vergrößerungen: 300x, 90x, 300x, 50x, 90x)

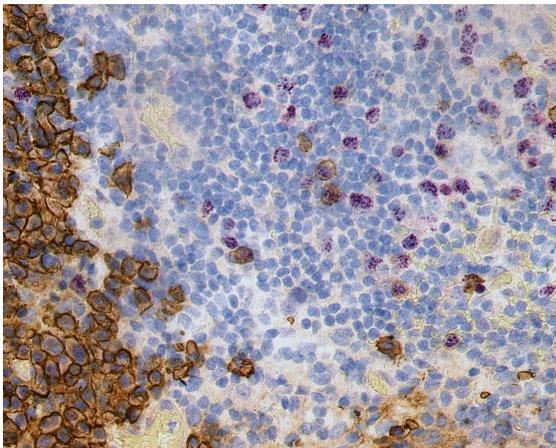
h) CD20/LN53



i) CD23/LN53



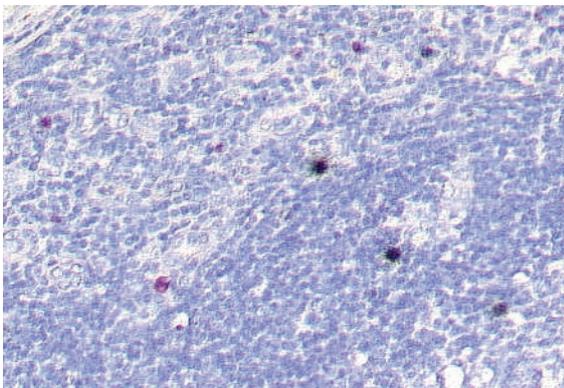
j) Syndecan/LN53



IH-Doppelmarkierung: h), i) und j) weitgehend fehlende Koexpression von CD20, CD23 und Syndecan (braune zytoplasmatische Signale) mit LN53 (rote, gepunktete nukleäre Signale) (Vergrößerung: 150x, 90x, 90x)

Abbildung 4: EBV und KSHV Nachweis

EBER/vCyclin



nicht radioaktive ISH und radioaktive ISH: keine Koexpression von EBER (rotes nukleäres Signal) und vCyclin (schwarze Körnung) (Vergrößerung: 90x)

3.4 Epstein-Barr Virus (EBV) Nachweis in KSHV-infizierten Zellen

Da das Epstein-Barr Virus zur gleichen Familie wie das KSHV gehört, ebenfalls B-Zellen befällt und onkogene Eigenschaften besitzt, wurden Doppelmarkierungen mit EBER und vCyclin (ISH) bei allen sieben KSHV positiven MC Proben vorgenommen. Diese zeigten, dass bei keinem der MC die KSHV positiven Zellen zugleich EBV positiv sind (Abbildung 4, S.46).

3.5 Zytotoxische T-Zell-Reaktion auf die KSHV-Infektion

Um zu klären, ob die KSHV-Infektion mit einer zytotoxischen T-Zell-Reaktion einhergeht, wurden IH mit Antikörpern gegen CD3, CD4 und CD8 bei je sieben KSHV positiven und sieben KSHV negativen MC durchgeführt. Der CD4+:CD8+ Quotient wurde geschätzt. Die Auswertung erfolgte durch zwei unabhängige Mitglieder des Instituts für Pathologie am UKBF.

Hier zeigte sich, dass das Verhältnis der 2 Subpopulationen zueinander bei den KSHV positiven Fällen deutlich zugunsten der CD8+T-Zellen im Sinne einer zytotoxischen T-Zell-Reaktion verschoben war (im Mittel CD4+:CD8+=1:4). Die Relation der CD4+ zu CD8+ T-Zellen variierte zwischen 1:3 und 1:8 (ohne Abbildung).

Bei den KSHV negativen Fällen zeigte sich ein normales Verhältnis mit einer Dominanz der CD4+ T-Helfer-Zellen. Diese waren im Mittel 6mal häufiger als die CD8+ T-Zellen mit Ausprägungen zwischen 4:1 bis 10:1 (CD4+:CD8+) (ohne Abbildung).

4 Diskussion

Das 1994 entdeckte humanpathogene γ 2-Herpesvirus genannt *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus* (KSHV) oder auch humanes Herpesvirus-8 (HHV-8) wurde initial in Kaposi Sarkomen (KS) nachgewiesen.¹ Die Infektion konnte überwiegend in den Spindelzellen des mesenchymalen Tumors lokalisiert werden.^{75,79}

Die Annahme, dass die Infektion mit dem KSHV eine wichtige Rolle in der Pathogenese des KS spielt, konnte durch seroepidemiologische Studien untermauert werden. Diese zeigten zum einen ein erhöhtes Risiko für KS in Bevölkerungen mit einer höheren Durchseuchungsrate und zum anderen einen Anstieg der Viruslast als prädiktiver Faktor für die Entstehung eines KS.^{58,60-62,65,68} Des Weiteren wurden mit der Entschlüsselung des Genoms anhand zweier Zelllinien Gene mit Homologie zu humanen Genen identifiziert, die auf Tumorsuppressor- und Protoonkogene wirken und die Apoptose beeinflussen.^{2,4,14,18,23,35,36,40,69,72} Es wurde außerdem nachgewiesen, dass das KSHV die Transformation von Endothel- zu den Spindelzellen des KS induzieren kann.¹³⁵

Interessanterweise konnte das Virus auch in anderen nicht-mesenchymalen Tumoren nachgewiesen werden, die gehäuft bei HIV-Infizierten auftreten. Zu diesen gehört das *primary effusion lymphoma* bzw. primäres Erguß Lymphom (PEL). Dies ist ein B-Zell-Lymphom, das mit Ergüssen in Körperhöhlen einhergeht und nur sehr selten in soliden Tumormassen auftritt. Die PEL-Zellen sind zu 100% positiv für das KSHV.^{94,96,97,101,102,110}

Eine weitere lymphoproliferative Erkrankung wurde mit dem KSHV in Verbindung gebracht: der M. Castleman (MC).^{56,23,33,84,89} Eine ätiologische Rolle wird hier kontrovers diskutiert, da nur ein geringer Teil der MC Fälle KSHV positiv ist.^{89,102} Hierbei handelte es sich hauptsächlich um die multizentrische Variante (MCD), die zumeist mit der Histologie eines plasmazellreichen M. Castleman einhergeht und klinisch durch einen sehr viel aggressiveren Verlauf als die lokalisierte Erkrankung charakterisiert ist.^{85,86,136} Die Untersuchungen am MC zum KSHV-Nachweis erfolgten zumeist mittels PCR nach Chang *et al.*¹ Lediglich eine Arbeit existierte zur genauen Lokalisation der infizierten Zellen und deren Phänotyp und Genexpressionsmuster. Paravicini *et al.* hatten beim MC mittels IH und ISH die KSHV positiven Zellen überwiegend in der Mantelzone der Follikel identifiziert und nachgewiesen, dass in diesen Zellen vIL-

6 exprimiert wird. Die KSHV positiven Zellen waren negativ für die Marker CD20, CD138, CD45RO, CD3, CD68, CD30, EMA und das EBV.²³

In dieser Arbeit sollte daher die Infektion des M. Castleman durch das KSHV genauer charakterisiert werden. Dazu wurden initial MC Proben von HIV+ und HIV- Patienten über eine PCR auf das Vorhandensein des Virus überprüft. Als Positivkontrolle wurden Kaposi Sarkome verwendet, der Negativkontrolle dienten eine Reihe unterschiedlicher Gewebe, u.a. HIV-Lymphadenopathien, Lymphome und gastrointestinale Erkrankungen. Bei den KSHV positiven Fällen wurden mittels *in situ* Hybridisierung und Immunhistologie die KSHV infizierten Zellen *in vivo* identifiziert, deren Genexpressionsmuster charakterisiert und im Anschluss durch immunhistologische Doppelmarkierungen der Phänotyp dieser Zellen analysiert. Über die Analyse des Genexpressionsmuster und aus der bekannten Funktion der kodierten Proteine ergeben sich Hinweise auf die mögliche Pathogenese der multizentrischen Form des M. Castleman.

Von den in dieser Arbeit untersuchten 45 Proben von 43 Patienten mit der Diagnose eines M. Castleman waren 7 Proben KSHV positiv (entsprechend 14%), wobei 6 der 7 Lymphadenektomien von HIV+ Patienten stammten. Bei der 7. Probe (C5) war der HIV-Status unbekannt. Histologisch ließen sich zwei der Proben dem plasmazellreichen und die übrigen fünf dem gemischten Typ zuordnen.

Die Ergebnisse des Screenings decken sich mit den Angaben aus der Literatur, dass nur ca. 30-40% der plasmazellreichen Castleman Tumoren KSHV positiv sind, während die hyalin-vaskulären Tumoren fast immer negativ sind.^{89,95,116} Auffällig war jedoch, dass der einzige MCD Fall (C13) in dieser Untersuchung KSHV negativ war, ist doch gerade diese Form mit dem KSHV in Verbindung gebracht worden und zu >90% positiv für das Virus.^{89,90}

Zur Lokalisation der KSHV positiven Zellen konnten wir folgendes Muster identifizieren. Es zeigte sich, dass die überwiegende Mehrzahl der KSHV infizierten Zellen in der Mantelzone der Follikel liegt, jedoch finden sich auch einzelne KSHV positive Zellen in den Keimzentren und der interfollikulären Zone. Morphologisch sind die Zellen ganz überwiegend Blasten zuzuordnen (mittelgroße Zellen mit einem großen zentralen oder randständigem Nukleus und bis zu drei Nukleoli). Sie sind von regulä-

ren Lymphozyten umgeben. Somit konnten wir die Ergebnisse von Parravicini *et al.*, die mittels Immunhistologie vIL-6 in zentroblastischen/immunoblastischen Zellen in der Mantelzone nachwiesen, bestätigen.²³ Spätere Arbeiten kommen zu den gleichen Ergebnissen und interpretieren, dass es sich bei den blastären KSHV positiven Zellen um eine neue plasmablastische Variante des M. Castleman handelt, die zu einem KSHV-assoziierten plasmablastischen Lymphom führen kann. Der Terminus plasmablastisch wurde von Dupin *et al.* aufgrund des ungewöhnlichen Phänotyps der immunoblastischen bzw. plasmablastischen Zellen geprägt.^{27,88,99,100,113,115} Später wird dies noch weiter ausgeführt.

Es gab erste Hinweise auf den Phänotyp der KSHV positiven Zellen beim M.Castleman durch die Arbeit von Parravicini *et al.* Sie fanden heraus, dass die Zellen negativ für CD20, CD138, CD45RO, CD3, CD68, CD30 und EMA und zudem nicht EBV positiv sind.²³

In der vorliegenden Untersuchung konnten diese Ergebnisse bestätigt und präzisiert werden. Die KSHV positiven Zellen weisen einen ungewöhnlichen Phänotyp auf. Es sind B-Zellen mit einer plasmazellulären Differenzierung, wie die Expression von CD38 praktisch aller infizierten Zellen, J-Kette (zu 91% positiv) und MUM1 (94,5%) bei fehlender Expression von CD20 zeigt. Sie produzieren ausschließlich Immunglobuline vom Typ IgM und zeigen eine Restriktion von λ -leicht Ketten. Trotzdem sind sie überwiegend negativ für die Plasmazellmarker CD138 und VS38c. Andere Antigene wie CD10 für Keimzentrumzellen, CD20 und CD79a als pan-B-Zell-Marker und CD23 als Aktivierungs- und FDC-Marker werden nicht oder nur zu einem geringen Prozentsatz exprimiert.

Marker für T-Zellen (CD3) oder Endothel (CD31/JC70A) sind ebenfalls ganz überwiegend negativ.

Auch in dieser Arbeit konnte keine Kolokalisation von EBV und KSHV in den infizierten Zellen nachgewiesen werden. Dies wurde auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt.^{88,99,115,137,138} Im Gegensatz dazu ist das PEL sehr häufig mit dem EBV koinfiziert und zudem CD30+ und EMA+.^{36,97,102,110}

In späteren Arbeiten konnte der hier gezeigte ungewöhnliche Phänotyp (MUM1+, J-Kette+, CD38+, CD138-, VS38c-, CD79a-) der KSHV positiven Zellen im M. Castleman bestätigt werden.^{99,100,138} In den neuesten Untersuchungen konnte ein neues Tumorsuppressorgen in nahezu 100% der KSHV positiven Zellen identifiziert wer-

den, das *PR domain containing 1 with zinc finger domain/ B lymphocyte-induced maturation protein 1* (PRDM1/BLIMP1). Dieses Gen ist ein Schlüsselgen in der terminalen B-Zell Regulation, beendet die Keimzentrumsreaktion und führt in den Zellen zur Expression von MUM1 und Immunglobulinen. Die Expression von BLIMP1 könnte somit zumindest teilweise den Immunphänotyp der KSHV-infizierten Blasten beim MC erklären.¹³⁸

Zusätzlich konnte CD27, ein Marker für B-Zellen, von Du *et al.* und Chadburn *et al.* in ca. 20-30% der KSHV positiven Zellen nachgewiesen werden.^{88,138} Chadburn *et al.* wiesen auch Ki67 bei 80 % der KSHV positiven Zellen nach.¹³⁸ Eine Diskrepanz besteht jedoch in dem Nachweis von CD20 in KSHV positiven Zellen von Dupin *et al.*^{100,115}, das in dieser Untersuchung in nur einem Fall von maximal 7% der infizierten Zellen exprimiert wurde. Zudem konnte durch Dupin *et al.* kein CD38 in KSHV positiven Zellen kolokalisiert werden.¹⁰⁰ Die Gründe hierfür sind unklar, wobei die hier vorliegenden Ergebnisse (CD20-, CD38+) im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen stehen.^{99,137,138}

In allen Untersuchungen wurde übereinstimmend die ausschließliche Expression von IgM mit einer λ -leicht Ketten Restriktion festgestellt.^{88,99,115,138} Mittels Immunglobulin-Gen Umlagerungsanalysen konnte eine klonale Umlagerung der Ig-Gene ausgeschlossen werden.^{88,99,115} Hierbei handelt es sich um ein sehr ungewöhnliches Phänomen, da eine polyklonale Umlagerung bei Ig für reaktive Prozesse steht, während die λ -leicht Ketten Restriktion bei MC für einen neoplastischen Prozess spricht.

Die Identifizierung des KSHV als erstes humanpathogenes γ -2-Herpesvirus und nahen Verwandten des EBV erfolgte bereits 1996 anhand einer PEL-Zelllinie.² Russo *et al.* konnten als erste die Nukleotidsequenz des Virus analysieren.⁴ Mittels KSHV positiver PEL-Zelllinien, die latent infiziert waren und chemisch in ein lytisches Infektionsmuster induziert wurden, wurden rasch die vom KSHV kodierten Gene identifiziert.^{4,28,36,41,139} Hier zeigten sich interessanterweise einige Gene mit Homologie zu humanen Genen, deren Proteine das Wachstum, die Angiogenese und die Apoptose beeinflussen. Dazu zählen u.a. vLANA, vCyclin D1, vGPCR, vMIP-1 α , vFLIP und vIL-6.^{20,40,69,72,77,140} Diese Gene und ihr Expressionsmuster standen aufgrund ihrer potentiell onkogenen Eigenschaften im Mittelpunkt der Forschung, um die Pathogenese der KSHV-assoziierten Erkrankungen zu klären. Zu einer latenten Infektion gehörig sind u.a. die Proteine bzw. Gene für vLANA, vCyclin D1 und vFLIP.^{28,39,41,139} Im

Rahmen einer lytischen Infektion kommt es zur Expression von vIL-6, vGPCR, vMIP-1 α und vMCP.^{12,13,20,141}

Das Genexpressionsmuster der Spindelzellen des KS ist gut charakterisiert. In über 90% der Spindelzellen sind die latenten Gene vCyclin D1 und vLANA nachweisbar mittels ISH.^{9,24,27,76,77,78} Dagegen werden vIL-6, vMCP und vMIP-1 α , die eine lytische Infektion anzeigen, von weniger als 1% der Zellen exprimiert.^{18,24,27,76,79,98,142}

Ähnlich verhält sich das Expressionsmuster beim PEL. Auch hier konnten vLANA und vCyclin in fast allen Zellen nachgewiesen werden, während vIL-6, vGPCR und vMIP-1 α von höchstens 5% der Zellen exprimiert wurde.^{10,24,41} Anhand dieser Ergebnisse wurde gefolgert, dass der Großteil der Tumorzellen (TZ) bei KS und PEL latent mit dem KSHV infiziert sind und nur ein geringer Prozentsatz der TZ eine lytische Infektion aufweist.^{10,41,45}

Im Gegensatz zu diesen beiden gut untersuchten Tumoren, wurde das Genexpressionsmuster des M. Castleman bisher noch so gut wie gar nicht charakterisiert. Lediglich vIL-6 war von einer Arbeitsgruppe im MC nachgewiesen worden.²³ Die genaue Analyse war Gegenstand der vorliegenden Arbeit und lässt sich wie folgt charakterisieren.

Die latenten KSHV-Gene vCyclinD1, vFLIP und vLANA wurden besonders häufig und mit starken Signalen in der Mantelzone (30-50 Zellen/MZ) exprimiert. Auch vIL-6 als lytisches Transkript konnte ebenso häufig nachgewiesen werden und lieferte starke Signale. Die Transkripte von vMCP, vMIP-1 α und vGPCR, die eine lytische Infektion nachweisen, zeigten zum Teil schwächere Signale und wurden von weniger Zellen (5-20 Zellen/MZ) exprimiert.

Diese Ergebnisse zeigen eine teils latente, teils lytische Infektion des M. Castleman durch das KSHV an. Sie bieten auch eine Erklärung für das Vorkommen von spezifischen Signalen bei den *sense*-Sonden, da es im Rahmen einer lytischen Infektion zur Produktion von Viren kommt und damit viel DNA anfällt. Das Vorliegen einer lytischen Infektion beim MC wurde durch weitere Arbeiten bestätigt.^{23,33,76,98,143}

Durch den Nachweis der o.g. Gene und die Analyse ihrer Funktion können Hinweise für die Pathogenese des KSHV-assoziierten M. Castleman gewonnen werden.

Bereits vor der Entdeckung des KSHV wurde die Dysregulation des IL-6 bei MCD als ursächlicher Faktor in der Pathogenese erkannt.⁸⁵ Physiologischerweise reguliert IL-6 das Immunsystem, bewirkt die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen und führt zur Ausschüttung von akute Phase Proteinen (z.B. CrP). Es spielt zudem eine wichtige Rolle in der Angiogenese via Induktion von VEGF.^{70,144} Auf die erhöhten Serum-IL-6 Spiegel werden daher vor allem die Plasmozytose, Hypergammaglobulinämie und das Fieber bei MC Patienten zurückgeführt.^{83,91,145} Belegt wird dieser Zusammenhang auch durch klinische Untersuchungen, bei denen diese Symptome bei MC Patienten durch eine Therapie mit monoklonalen Antikörpern gegen IL-6 bzw. den IL-6-Rezeptor zum Abklingen gebracht werden.^{93,146} Die Entdeckung eines humanen IL-6 (hull-6) Homologes im Genom des KSHV ist daher von großem Interesse, zudem Zellproliferations-Analysen u.a. an IL-6 abhängigen humanen Myelom- und PEL-Zellen große Gemeinsamkeiten zwischen den beiden IL-6 Homologen aufdeckten.^{18,19,21}

Das vIL-6 wirkt ebenso wie hull-6 über die gp130-Untereinheit des IL-6R.^{17,19,20} Die Wirkung am Rezeptor ist aber im Gegensatz zu hull-6 unabhängig von der gp80-Untereinheit. Die Signalweiterleitung verläuft bei beiden IL-6 über eine Tyrosin Kinase (JAK) mit der *signal transducers and activators of transcription* (STAT) phosphoryliert werden. So kann vIL-6 die Transkription von Genen beeinflussen.^{17,20} Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Antikörper gegen die gp80-Untereinheit die Wirkung von hull-6 nicht aber von vIL-6 inhibieren.¹⁷ Da an der gp80-Untereinheit Interferon- α ansetzt, um den Zellzyklus zu stoppen, kann sich das Virus so der IFN- α induzierten Immunabwehr entziehen. Dies wurde an PEL-Zellen demonstriert.¹⁴⁷ Durch diesen Mechanismus kann das KSHV im Körper persistieren und die Produktion des Virus unterstützen, indem es das Überleben der infizierten Zelle verlängert. Ein weiterer pathogenetisch relevanter Aspekt des vIL-6 ist die Induktion von *vascular endothelial growth factor* (VEGF), wie an Mäusen gezeigt werden konnte.^{21,70} Eine erhöhte VEGF-Expression in den Keimzentren mit vermehrter Vaskularisation bei MCD waren zuvor beschrieben worden ohne aber die Ursache zu kennen.¹⁴⁸ Unter dem Aspekt, dass vIL-6 die Bildung von VEGF induziert, könnte dieses wichtige histologische Merkmal des MCD der KSHV- Infektion zugeschrieben werden.

Ebenfalls an Mäusen konnte die Wirkung von vIL-6 auf die Hämatopoese belegt werden. Wenn Mäusen vIL-6 injiziert wurde, so zeigten sie eine massive Plasmozy-

tose mit polyklonaler Hypergammaglobulinämie und eine verstärkte Hämatopoese aller Reihen, ähnlich den histologischen und Laborbefunden bei MCD Patienten.²¹

Desweiteren induziert vIL-6 die Produktion von huIL-6 in verschiedenen Zelllinien, so dass hieraus die beschriebene IL-6- Dysregulation mit erhöhten IL-6 Plasmaspiegeln bei MCD-Patienten entstehen könnte.^{136,149}

Die hier ausgeführten Forschungsergebnisse zeigen wie das vIL-6 zu den histologischen Charakteristiken des MCD, nämlich der Plasmozytose und der vermehrten Vaskularisation (via VEGF) führen kann. Inwieweit die Veränderungen auf vIL-6 allein oder aber auf huIL-6 bzw. deren Kombination zurückzuführen sind, bleibt zu klären.

Aber auch die anderen KSHV-kodierten Proteine können zu Veränderungen führen, die beim M. Castleman auftreten. So kann das virale *macrophage inflammatory protein-1α* (vMIP-1α) als Chemokin und Homolog zu humanen MIP-1α eine angiogenetische Wirkung entfalten.^{20,26} Es konnte gezeigt werden, dass es die Expression von VEGF stimuliert.¹⁵⁰ Somit kann es im Zusammenspiel mit vIL-6 zur vermehrten Vaskularisation der Keimzentren bei MCD beitragen.

Für virales *latency-associated nuclear antigen* (vLANA) konnten mehrere Funktionen identifiziert werden. Zum einen trägt es zur Replikation des KSHV bei, indem es die episomale (zirkuläre) DNA des Virus an die zelluläre DNA während der Interphase und Mitose bindet und diese so vor einem Abbau schützt.¹⁴⁰ Zum anderen interagiert es mit zwei wichtigen Tumorsuppressorgenen, dem p53 und dem Retinoblastom Protein (pRB), und kann so effektiv die Apoptose der KSHV infizierten Zellen inhibieren.^{151,152} Desweiteren konnte gezeigt werden, dass vLANA eine Zunahme der zellulären IL-6 Produktion bewirkt, indem es an den IL-6-Promotor bindet und über die AP1 Signalkaskade (entsprechend der JNK) eine vermehrte Transkription induziert.¹⁵³

Ein weiteres Gen mit Homologie zu einem humanen Gen ist das vCyclin D1.^{9,69,77} Es bildet wie die humanen D-Cycline mit einer *Cyclin-dependent* Kinase (cdk6) einen Kinase Komplex und wirkt inhibitorisch auf das pRB.^{7,8,11} Interessant ist, dass der Komplex resistent gegen die regulären Inhibitoren der Cycline ist, so dass eine pRB unabhängige Progression des Zellzyklus über die G₁-Phase hinaus in den KSHV infizierten Zellen induziert wird.¹¹ *In vitro* konnte dies an Fibroblasten demonstriert wer-

den.¹¹ So trägt die Expression von vCyclin möglicherweise zur Persistenz des Virus und einer Vermehrung der infizierten Zellen im Organismus bei.

Der virale transmembranöse *G-protein coupled receptor* (vGPCR) ist nahe verwandt mit den humanen IL-8-Rezeptoren.⁷¹ Sein Vorhandensein ist essentiell für die Aktivierung latent infizierter Zellen zu einer lytischen Infektion durch Chemokine.¹⁵⁴ Sein onkogenes Potential wurde an transgenen Mäusen demonstriert, bei denen KS-ähnliche Läsionen durch vGPCR ausgelöst werden konnten.²⁹ Über den Rezeptor können mehrere Signalkaskaden aktiviert werden (u.a. IP-Phospholipase C, JNK/SAPK und p38MAPK) und so die Expression von VEGF induzieren.^{29,32} Da aber nur wenige Zellen vGPCR exprimieren, entsteht seine transformatorische Wirkung über parakrine Effekte.^{155,156} In dieser Arbeit konnte die nur geringe Expression von vGPCR im M. Castleman demonstriert werden.

Zuletzt soll die mögliche Funktion des viralen *FLICE-inhibitory protein* (vFLIP) beleuchtet werden. Als virales Homolog zu zellulären FLIPs, die vor allem in Muskel- und lymphoiden Geweben exprimiert werden, kann es die infizierten Zellen der durch Fas (CD95) medierte Apoptose entziehen.^{14,72} Des Weiteren kann es NFκB induzieren, das als Transkriptionsfaktor die Expression von Zytokinen, MHC-Genen und Zelladhäsionsmolekülen reguliert.¹⁵⁷ Durch diese Funktionen kann vFLIP zur Persistenz des Virus im Organismus beitragen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das KSHV eine Vielzahl von Genen kodiert, die das Zellwachstum durch einen Eingriff in den Zellzyklus aktivieren, sowie die Apoptose durch p53, pRB und CD95 inhibieren, die in B-Zellen eine plasmazelluläre Differenzierung induzieren können und die Angiogenese via VEGF stimulieren. Da diese Gene in der vorliegenden Arbeit bei KSHV positiven M. Castleman nachgewiesen werden konnten, können die histologischen Veränderungen beim M. Castleman (Plasmozytose, vermehrte Vaskularisation, polyklonale Gammopathie) mit der KSHV Infektion in Zusammenhang gebracht werden.

Klinische Untersuchungen zeigten, dass die Prognose des KSHV positiven MCD schlechter ist als bei der KSHV negativen Variante.^{23,92,103} Besonders HIV+ Patienten sind gefährdet einen KSHV positiven MCD zu bekommen.^{158,159} Unter *highly active antiretroviral therapy* (HAART) kam es zum Auftreten bzw. zur Progression des MCD

mit einer sehr schlechten Prognose.^{160,161} Ursächlich hierfür könnte das Entstehen von Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) sein, die signifikant häufiger bei HIV+ MCD Patienten auftreten (15-fach) als in der HIV+ Population ohne MCD.¹³⁷ Im Vordergrund stehen hierbei KSHV assoziierte Erkrankungen, wie das bereits erwähnte plasmablastische B-Zell-Lymphom, klassisches PEL und PEL-ähnliche Tumoren.^{99,110,137} In einer weiteren Studie von Dupin *et al.* mit MCD Patienten starben 4 von 13 Patienten innerhalb 9 Monate nach Diagnosestellung eines KSHV positiven M. Castleman an einem KSHV positiven plasmablastischen Lymphom.¹¹⁵ Der Phänotyp der Plasmablasten bei MCD und dem Lymphom stimmte überein (IgM λ , EBV-).¹¹⁵ Das plasmablastische Lymphom geht mit einer extrem schlechten Prognose einher, so dass ein rasches therapeutisches Vorgehen erforderlich ist.^{115, 137,162}

Bezüglich der lokalen Immunreaktion auf die KSHV Infektion konnte in dieser Arbeit mittels IH eine Verschiebung der normalen 2:1 Relation der CD4+T-Helfer-Zellen zu den CD8+T- Zellen demonstriert werden. In den KSHV positiven M. Castleman konnten CD8+T-Zellen bis zu 8mal häufiger als CD4+T-Zellen nachgewiesen werden. Im Mittel betrug das Verhältnis 1:4 der CD4+:CD8+T-Zellen. Diese zytotoxische T-Zell-Reaktion konnte in den KSHV negativen Fällen nicht identifiziert werden. Sie stellt offenbar die antivirale Reaktion des Organismus auf die KSHV-Infektion dar, kann allerdings auch Ausdruck einer zytotoxischen Reaktion auf die HIV-Infektion sein. So wurde bereits für andere Herpesviren (z.B. HSV-1, EBV) eine zytotoxische T-Zell-Reaktion, die MHC-I und Interferon- γ (IFN- γ) vermittelt zur Apoptose der infizierten Zelle führt, als typische Antwort des Organismus auf die Infektion beschrieben.^{163,164,165}

In dieser Arbeit konnten weitere Hinweise auf den Zusammenhang der KSHV-Infektion mit der Pathogenese des M. Castleman aufgezeigt werden. Die KSHV infizierten Zellen liegen größtenteils in der Mantelzone der Follikel. Ihr ungewöhnlicher Phänotyp (CD38+, MUM1+, J-Kette+, CD20-, CD138-, VS38c-, CD79a-, IgM+, λ -leichte Kette+, EBV-) kennzeichnet sie als Plasmablasten, aus denen wahrscheinlich durch monoklonale Expansion ein neuartiges Lymphom entstehen kann. Es liegt eine teils lytische Infektion der Zellen durch das KSHV vor, wie durch die Analyse des Genexpressionsmusters gezeigt werden konnte. Die Zellen exprimieren sowohl die latenten Gene vLANA, vFLIP und vCyclin D1 als auch lytische Gene wie vIL-6,

vGPCR, vMIP-1 α und vMCP. Da diese Gene Homologien zu humanen Genen bzw. zu Genen bekannter onkogener Herpesviren (HSV und EBV) aufweisen, die in den Zellzyklus, die Apoptose, Angiogenese und Hämatopoese eingreifen, wird dem KSHV ein transformierendes Potential zugesprochen. Nach Analyse der Funktion der Gene könnte das Virus sowohl die histologischen Veränderungen des M. Castleman (Plasmozytose, hyperplastische Follikel, vermehrte Vaskularisation interfollikulär und in den Keimzentren) als auch die klinischen und laborchemischen Veränderungen (Fieber, generalisierte Lymphadenopathie, erhöhte BSR und polyklonale Hypergammaglobulinämie) induzieren. Unbeantwortet ist die Frage, wieso das KSHV beim M. Castleman nahezu ausschließlich IgM λ exprimierende B-Zellen befällt. Zur Klärung dieser Frage sind sicherlich weitere Studien erforderlich.

5 Zusammenfassung

Die seltene lymphoproliferative Erkrankung, der Morbus Castleman (MC), tritt in seiner multizentrischen und plasmazellreichen Form gehäuft bei Patienten mit den KSHV-assoziierten Erkrankungen Kaposi-Sarkom (KS) und primäres Erguß Lymphom (PEL) auf. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, die möglichen Zielzellen der KSHV-Infektion beim MC, deren Phänotyp und Genexpressionsmuster zu charakterisieren, um Einsichten in die Pathogenese dieser Erkrankung zu gewinnen.

Durch ein initiales Screening mittels hochsensitiver PCR wurde das KSHV in 14% der MC Fälle nachgewiesen. Mit morphologischen Methoden (Immunhistologie und in situ Hybridisierung) konnte die virale Infektion blastären lymphatischen Zellen im Follikelmantel zugeordnet werden. Doppelmarkierungen zeigten einen ungewöhnlichen Phänotyp der infizierten Zellen mit Expression von Plasmazellmarkern wie MUM1, CD38 und der J-Kette bei überwiegend fehlendem Nachweis von CD20 und CD3 sowie monotypischer Expression von IgM λ . Das Genexpressionsmuster war charakterisiert durch eine starke Expression von vLana, vCyclin D1, vIL-6 und vFLIP bei variablem und schwächerem Nachweis von vGPCR, vMIP-1a und vMCP. Dieses Muster belegt eine häufige lytische KSHV-Infektion beim MC im Gegensatz zum KS und PEL, die durch eine vorherrschend latente Infektion charakterisiert sind.

Das nachgewiesene Expressionsmuster kann eine Reihe von typischen histologischen Befunden des MC erklären. vIL-6 kann durch Bindung an den humanen IL-6R die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen induzieren, so dass die reaktive Plasmozytose des MC durchaus Folge einer starken vIL-6 Sekretion sein kann. vIL-6, vGPCR und vMIP-1a induzieren eine Expression von VEGF, einem Wachstumsfaktor von Endothelien. Die Expression dieser viralen Cytokine kann somit die vermehrte Vaskularisation beim MC erklären. Offen blieb die Frage, wieso das Virus lymphatische Zellen mit monotypischer Expression von IgM λ befällt, obwohl nach Daten der Literatur hier keine klonale lymphatische Erkrankung vorliegt.

6 Literaturverzeichnis

- ¹ *Chang Y, Cesarman E, et al.*: Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 266: 1865-1869, 1994
- ² *Moore PS, Gao S-J, et al.*: Primary characterization of a herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcoma. *J Virol* 70(1): 549-558, 1996
- ³ *Judde J-G, Lacoste V, et al.*: Monoclonality or oligoclonality of human herpesvirus 8 terminal repeat sequences in Kaposi's sarcoma and other diseases. *J Natl Cancer Inst* 92(9): 729-736, 2000
- ⁴ *Russo JJ, Bohenzky RA, et al.*: Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14862-14867, 1996
- ⁵ *Hayward GS*: KSHV strains: the origins and global spread of the virus. *Semin Cancer Biol* 9: 187-199, 1999
- ⁶ *Cesarman E, Nador RG, et al.*: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus contains G protein-coupled receptor and cyclin D homologs which are expressed in Kaposi's sarcoma and malignant lymphoma. *J Virol* 70(11): 8218-8223, 1996
- ⁷ *Godden-Kent D, Talbot SJ, et al.*: The cyclin encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus stimulates cdk6 to phosphorylate the retinoblastoma protein and histone H1. *J Virol* 71(6): 4193-4198, 1997
- ⁸ *Li M, Lee H, Yoon D-W, et al.*: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional cyclin. *J Virol* 71(3): 1984-1991, 1997
- ⁹ *Reed JA, Nador RG, et al.*: Demonstration of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus Cyclin D homolog in cutaneous Kaposi's sarcoma by colorimetric in situ hybridization using a catalyzed signal amplification system. *Blood* 91(10): 3825-3832, 1998
- ¹⁰ *Teruya-Feldstein J, Zauber P, et al.*: Expression of human herpesvirus-8 oncogene and cytokine homologues in an HIV-seronegative patient with multicentric Castleman's disease and primary effusion lymphoma. *Lab Invest* 78(12): 1637-1642, 1998
- ¹¹ *Swanton C, Mann DJ, et al.*: Herpes viral cyclin/ Cdk6 complexes evade inhibition by CDK inhibitor proteins. *Nature* 390: 184-187, 1997
- ¹² *Boshoff C*: Coupling herpesvirus to angiogenesis. *Nature* 391: 24-25, 1998
- ¹³ *Sun R, Lin S-F, et al.*: Kinetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression. *J Virol* 73(3): 2232-2242, 1999

-
- ¹⁴ *Thome M, Schneider P, et al.*: Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386: 517-521, 1997
- ¹⁵ *Liu L, Eby MT, et al.*: The human herpesvirus 8-encoded viral FLICE inhibitory protein physically associates with and persistently activates the I κ B kinase complex. *J Biol Chem* 277: 13745-51, 2002
- ¹⁶ *Kliche S, Nagel W, et al.*: Signaling by human herpesvirus 8 *kaposin* A through direct membrane recruitment of *cytohesin-1*. *Mol Cell* 7: 833-843, 2001
- ¹⁷ *Molden J, Chang Y, et al.*: A Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded cytokine homolog (vIL-6) activates signaling through the shared gp130 receptor subunit. *J Biol Chem* 272(31): 19625-19631, 1997
- ¹⁸ *Moore PS, Boshoff C, et al.*: Molecular mimicry of human cytokine and cytokine response pathway genes by KSHV. *Science* 274: 1739-1744, 1996
- ¹⁹ *Burger R, Neipel F, et al.*: Human herpesvirus type 8 interleukin-6 homologue is functionally active on human myeloma cells. *Blood* 91(6): 1858-1863, 1998
- ²⁰ *Nicholas J, Ruvolo VR, et al.*: Kaposi's sarcoma-associated human herpesvirus-8 encodes homologues of macrophage inflammatory protein-1 and interleukin-6. *Nat Med* 3(3): 287-292, 1997
- ²¹ *Aoki Y, Jaffe ES, et al.*: Angiogenesis and hematopoiesis induced by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded interleukin-6. *Blood* 93(12): 4034-4043, 1999
- ²² *Asou H, Said JW, et al.*: Mechanisms of growth control of Kaposi's sarcoma-associated herpes virus-associated primary effusion lymphoma cells. *Blood* 91(7): 2475-2481, 1998
- ²³ *Parravicini C, Corbellino M, et al.*: Expression of a virus-derived cytokine, KSHV vIL-6, in HIV-seronegative Castleman's disease. *Am J Pathol* 151(6): 1517-1522, 1997
- ²⁴ *Parravicini C, Chandran B, et al.*: Differential viral protein expression in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-infected diseases Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castleman's disease. *Am J Pathol* 156(3): 743-749, 2000
- ²⁵ *Chatterjee M, Osborn J, et al.*: Viral interleukin-6-induced cell proliferation and immune evasion of interferon activity. *Science* 298: 1432-1435, 2002
- ²⁶ *Boshoff C, Endo Y, et al.*: Angiogenic and HIV-inhibitory functions of KSHV-encoded chemokines. *Science* 278: 290-294, 1997

-
- ²⁷ *Katano H, Sato Y, et al.*: Expression and localisation of human herpesvirus 8-encoded proteins in primary effusion lymphoma, Kaposi's sarcoma, and multicentric Castleman's disease. *Virology* 269: 335-344, 2000
- ²⁸ *Nicholas J, Ruvolo VR, et al.*: A single 13-kilobase divergent locus in the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genome contains nine open reading frames that are homologous to or related to cellular proteins. *J Virol* 71(3): 1963-1974, 1997
- ²⁹ *Bais C, Santomasso B, et al.*: G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator. *Nature* 391: 86-89, 1998
- ³⁰ *Fiorelli V, Gendelman R, et al.*: γ -interferon produced by CD8+ t cells infiltrating Kaposi's sarcoma induces spindle cells with angiogenic phenotype and synergy with human immunodeficiency virus-1 tat protein: an immune response to human herpesvirus-8 infection? *Blood* 91(3): 956-967, 1998
- ³¹ *Nador RG, Milligan LL, et al.*: Expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor monocistronic and bicistronic transcripts in primary effusion lymphomas. *Virology* 287: 62-70, 2001
- ³² *Geras-Raaka E, Arvanitakis L, et al.*: Inhibition of constitutive signaling of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor by protein kinases in mammalian cells in culture. *J Exp Med* 187(5): 801-806, 1998
- ³³ *Luppi M, Barozzi P, et al.*: Expression of cell-homologous genes of human herpesvirus-8 in human immunodeficiency virus-negative lymphoproliferative diseases. *Blood* 94(8): 2931-2933, 1999
- ³⁴ *Holst PJ, Rosenkilde MM, et al.*: Tumorigenesis induced by the HHV-8-encoded Chemokine receptor requires ligand modulation of high constitutive activity, *J Clin Invest* 108: 1789-1769, 2001
- ³⁵ *Boshoff C, Gao S-J, et al.*: Establishing a KSHV+ cell line (bcp-1) from peripheral blood and characterizing its growth in nod/SCID mice. *Blood* 91(5): 1671-1679, 1998
- ³⁶ *Cesarman E, Moore PS, et al.*: *In vitro* establishment and characterization of two acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma cell lines (bc-1 and bc-2) containing Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like (KSHV) DNA sequences. *Blood* 86(7): 2708-2714, 1995

-
- ³⁷ Jenner RG, Albà MM, et al.: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent and lytic gene expression as revealed by DNA arrays. *J Virol* 75(2): 891-902, 2001
- ³⁸ Renne R, Zhong W, et al.: Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture. *Nat Med* 2(3): 342-346, 1996
- ³⁹ Kedes DH, Lagunoff M, et al.: Identification of the gene encoding the major latency-associated nuclear antigen of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Clin Invest* 100: 2606-2610, 1997
- ⁴⁰ Rainbow L, Platt GM, et al.: The 222- to 234-kilodalton latent nuclear protein (LNA) of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (HHV8) is encoded by ORF73 and is a component of the latency-associated nuclear antigen. *J Virol* 71(8): 5915-5921, 1997
- ⁴¹ Miller G, Heston L, et al.: Selective switch between latency and lytic replication of Kaposi's sarcoma herpesvirus and Epstein-Barr virus in dually infected body cavity lymphoma cells. *J Virol* 71(1): 314-324, 1997
- ⁴² Haque M, Ueda K, et al.: Major histocompatibility complex class I molecules are down-regulated at the cell surface by the K5 protein encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8. *J General Virol* 82: 1175-1180, 2001
- ⁴³ Sun R, Lin S-F, et al.: A viral gene that activates lytic cycle expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 10866-10871, 1998
- ⁴⁴ Sun R, Lin S-F, et al.: Polyadenylylated nuclear RNA encoded by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11883-11888, 1996
- ⁴⁵ Zhong W, Wang H, et al.: Restricted expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genes in Kaposi's sarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6641-6646, 1996
- ⁴⁶ Zimring JC, Goodbourn S, et al.: Human herpesvirus 8 encodes an interferon regulatory factor (IRF) homolog that represses IRF-1-mediated transcription. *J Virol* 72(1): 701-707, 1998
- ⁴⁷ O'Neill E, Douglas JL, et al.: Open reading frame 26 of human herpesvirus 8 encodes a tetradecanoyl phorbol acetate- and butyrate-inducible 32-kilodalton protein expressed in a body cavity-based lymphoma cell line. *J Virol* 71(6): 4791-4797, 1997
- ⁴⁸ Kaposi M: Idiopathic multiple pigmented sarcoma of the skin. *Arch Dermatol Syphil* 4: 265-273, 1872
- ⁴⁹ Enzinger FM, Weiss SW: Kaposi's sarcoma. In: *Soft tissue tumors*, eds. Enzinger FM, Weiss SW. 4th edition, Mosby, St. Louis, Missouri, USA: 938-947, 2001

-
- ⁵⁰ *Beral V, Peterman TA, et al.*: Kaposi's sarcoma among persons with AIDS: a sexually transmitted infection? *Lancet* 335: 123-128, 1990
- ⁵¹ *Kedes DH, Operskalski E, et al.*: The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus): distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. *Nat Med* 2(8): 918-924, 1996
- ⁵² *Ambroziak JA, Blackbourn DJ, et al.*: Herpes-like sequences in HIV-infected and uninfected Kaposi's sarcoma patients. *Science* 268: 582-583, 1995
- ⁵³ *Boshoff C, Whitby D, et al.*: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in HIV-negative Kaposi's sarcoma. *Lancet* 345: 1043-1044, 1995
- ⁵⁴ *Collandre H, Ferris S, et al.*: Kaposi's sarcoma and new herpesvirus. *Lancet* 345: 1043, 1995
- ⁵⁵ *Dictor M, Rambech E, et al.*: Human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) DNA in Kaposi's sarcoma lesions, AIDS Kaposi's sarcoma cell lines, endothelial Kaposi's sarcoma simulators, and the skin of immunosuppressed patients. *Am J Pathol* 148(6): 2009-2016, 1996
- ⁵⁶ *Dupin N, Gorin I, et al.*: Herpes-like DNA sequences, AIDS-related tumors, and Castleman's disease. Letter to the editor. *N Engl J Med* 333(12): 798, 1995
- ⁵⁷ *Huang YQ, Li JJ, et al.*: Human herpesvirus-like nucleic acid in various forms of Kaposi's sarcoma. *Lancet* 345: 759-761, 1995
- ⁵⁸ *Moore PS, Chang Y*: Detection of herpesvirus-like DNA sequences in Kaposi's sarcoma in patients with and those without HIV infection. *N Engl J Med* 332(18): 1181-1185, 1995
- ⁵⁹ *Noel JC*: Kaposi's sarcoma and KSHV. *Lancet* 346: 1359, 1995
- ⁶⁰ *Gao S-J, Kingsley L, et al.*: Seroconversion to antibodies against Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-related latent nuclear antigens before the development of Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med* 335: 233-241, 1996
- ⁶¹ *Gao S-J, Kingsley L, et al.*: KSHV antibodies among Americans, Italians and Ugandans with and without Kaposi's sarcoma. *Nat Med* 2(8): 925-928, 1996
- ⁶² *Lennette ET, Blackbourn DJ, et al.*: Antibodies to human herpesvirus type 8 in the general population and in Kaposi's sarcoma patients. *Lancet* 348: 858-861, 1996
- ⁶³ *Lin S-F, Sun R, et al.*: Identification, expression, and immunogenicity of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded small viral capsid antigen. *J Virol* 71(4): 3069-3076, 1997

-
- ⁶⁴ *Miller G, Rigsby MO, et al.*: Antibodies to butyrate-inducible antigens of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in patients with HIV-1 infection. *N Engl J Med* 334: 1292-1297, 1996
- ⁶⁵ *Serraino D, Songini M, et al.*: Human herpesvirus 8 seroprevalence in Sardinia. *J Natl Cancer Inst* 90(13): 1012-1013, 1998
- ⁶⁶ *Shingadia D, Howard MR, et al.*: Kaposi's sarcoma and KSHV. *Lancet* 346: 1359-1360, 1995
- ⁶⁷ *Harrington WJ Jr., Bagasra O, et al.*: Human herpesvirus type 8 DNA sequences in cell-free plasma and mononuclear cells of Kaposi's sarcoma patients. *J Infect Dis* 174: 1101-1105, 1996
- ⁶⁸ *Whitby D, Howard MR, et al.*: Detection of Kaposi sarcoma associated herpesvirus in peripheral blood of HIV-infected individuals and progression to Kaposi's sarcoma. *Lancet* 346: 799-802, 1995
- ⁶⁹ *Chang Y, Moore PS, et al.*: Cyclin encoded by KS herpesvirus. *Nature* 382: 410, 1996
- ⁷⁰ *Cohen T, Nahari D, et al.*: Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 271(2): 736-741, 1996
- ⁷¹ *Guo H-G, Browning P, et al.*: Characterization of a chemokine receptor-related gene in human herpesvirus 8 and its expression in Kaposi's sarcoma. *Virology* 228: 371-378, 1997
- ⁷² *Irmeler M, Thome M, et al.*: Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388: 190-195, 1997
- ⁷³ *Lee H, Veazey R, et al.*: Deregulation of cell growth by the K1 gene of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Nat Med* 4(4): 435-441, 1998
- ⁷⁴ *Muralidhar S, Pumfery AM, et al.*: Identification of kaposin (open reading frame K12) as a human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) transforming gene. *J Virol* 72: 4980-4988, 1998
- ⁷⁵ *Boshoff C, Schulz TF, et al.*: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infects endothelial and spindle cells. *Nat Med* 1(12): 1274-1278, 1995
- ⁷⁶ *Brousset P, Cesarman E, et al.*: Colocalization of the viral interleukin-6 with latent nuclear antigen-1 of human herpesvirus-8 in endothelial spindle cells of Kaposi's sarcoma and lymphoid cells of multicentric Castleman's disease. *Hum Pathol* 32(1): 95-100, 2001

-
- ⁷⁷ *Davis MA, Stürzl M, et al.*: Expression of human herpesvirus 8-encoded cyclin D in Kaposi's sarcoma spindle cells. *J Natl Cancer Inst* 89: 1868-1874, 1997
- ⁷⁸ *Katano H, Sato Y, et al.*: High expression of HHV-8-encoded ORF73 protein in spindle-shaped cells of Kaposi's sarcoma. *Am J Pathol* 155(1): 47-52, 1999
- ⁷⁹ *Staskus KA, Zhong W, et al.*: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression in endothelial (spindle) tumor cells. *J Virol* 71(1): 715-719, 1997
- ⁸⁰ *Stürzl M, Blasig C, et al.*: Expression of HHV-8 latency-associated T0.7 RNA in spindle cells and endothelial cells of AIDS-associated, classical and African Kaposi's sarcoma. *Int J Cancer* 72: 68-71, 1997
- ⁸¹ *Blasig C, Zietz C, et al.*: Monocytes in Kaposi's sarcoma lesions are productively infected by human herpesvirus 8. *J Virol* 71(10): 7963-7968, 1997
- ⁸² *Sirianni MC, Vincenzi L, et al.*: γ -Interferon production in peripheral blood mononuclear cells and tumor infiltrating lymphocytes from Kaposi's sarcoma patients: correlation with the presence of human herpesvirus-8 in peripheral blood mononuclear cells and lesional macrophages. *Blood* 91(3): 968-976, 1998
- ⁸³ *Aoki Y, Yarchoan R, et al.*: Detection of viral interleukin-6 in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-linked disorders. *Blood* 97(7): 2173-2176, 2001
- ⁸⁴ *Kikuta H, Itakura O, et al.*: Tropism of human herpesvirus 8 for peripheral blood lymphocytes in patients with Castleman's disease. *Br J Haematol* 99: 790-793, 1997
- ⁸⁵ *Peterson BA, Frizzera G*: Multicentric Castleman's disease. *Semin Oncol* 20(6): 636-647, 1993
- ⁸⁶ *Schnitzer B*: The Reactive Lymphadenopathies. In: Knowles DM (ed): *Neoplastic Hematopathology*. 2nd edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, S. 429-433, 2001
- ⁸⁷ *Castleman B, Iverson L, et al.*: Localized mediastinal lymph-node hyperplasia resembling thymoma. *Cancer* 9: 822-830, 1956
- ⁸⁸ *Du M-Q, Liu H, et al.*: Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infects monotypic (IgM λ) but polyclonal naive B cells in Castleman disease and associated lymphoproliferative disorders. *Blood* 97(7): 2130-2136, 2001
- ⁸⁹ *Soulier J, Grollet L, et al.*: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castleman's disease. *Blood* 86(4): 1276-1280, 1995
- ⁹⁰ *Gessain A, Sudaka A, et al.*: Kaposi's sarcoma-associated herpes-like virus (human herpesvirus type 8) DNA sequences in multicentric Castleman's disease: is

there any relevant association in non-human immunodeficiency virus-infected patients? *Blood* 1996: 414-416, 1996

⁹¹ *Aoki Y, Tosato G, et al.*: Serum viral interleukin-6 in AIDS-related multicentric Castleman's disease. *Blood* 97(8): 2526-2527, 2001

⁹² *Oksenhendler E, Carcelain G, et al.*: High levels of human herpesvirus 8 viral load, human interleukin-6, interleukin-10, and C reactive protein correlate with exacerbation of multicentric Castleman's disease in HIV-infected patients. *Blood* 96(6): 2069-2073, 2000

⁹³ *Foussat A, Fior R, et al.*: Involvement of human interleukin-6 in systemic manifestations of human herpesvirus type 8-associated multicentric Castleman's disease. *AIDS* 13(1): 150-152, 1999

⁹⁴ *Cesarman E, Chang Y, et al.*: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N Engl J Med* 332(18): 1186-1191, 1995

⁹⁵ *Gessain A, Brière J, et al.*: Human herpes virus 8 (Kaposi's sarcoma herpes virus) and malignant lymphoproliferations in France: a molecular study of 250 cases including two AIDS-associated body cavity based lymphomas. *Leukemia* 11: 266-272, 1997

⁹⁶ *Hsi ED, Foreman KE, et al.*: Molecular and pathologic characterization of an AIDS-related body cavity-based lymphoma, including ultrastructural demonstration of human herpesvirus-8. *Am J Surg Pathol* 22(4): 493-499, 1998

⁹⁷ *Banks PM, Warnke RA*: Primary effusion lymphoma. Ed. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and genetics of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC Press, Lyon: S. 179-180, 2001

⁹⁸ *Staskus KA, Sun R, et al.*: Cellular tropism and viral interleukin-6 expression distinguish human herpesvirus 8 involvement in Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castleman's disease. *J Virol* 73(5): 4181-4187, 1999

⁹⁹ *Ascoli V, Signoretti S, et al.*: Primary effusion lymphoma in HIV-infected patients with multicentric Castleman's disease. *J Pathol* 193: 200-209, 2001

¹⁰⁰ *Dupin N, Fisher C, et al.*: Distribution of human herpesvirus-8 latently infected cells in Kaposi's sarcoma, multicentric Castleman's disease, and primary effusion lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4546-4551, 1999

-
- ¹⁰¹ *Gaidano G, Gloghini A, et al.*: Association of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-positive primary effusion lymphoma with expression of the CD138/ Syndecan-1 antigen. *Blood* 90(12): 4894-4900, 1997
- ¹⁰² *Nador RG, Cesarman E, et al.*: Herpes-like DNA sequences in a body-cavity-based lymphoma in an HIV-negative patient. *N Engl J Med* 333(14): 943, 1995
- ¹⁰³ *Chadburn A, Cesarman E, et al.*: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus sequences in benign lymphoid proliferations not associated with human immunodeficiency virus. *Cancer* 80(4): 788-797, 1997
- ¹⁰⁴ *Karcher DS, Alkan S*: Herpes-like DNA sequences, AIDS-related tumors, and Castleman's disease. Letter to the editor. *N Engl J Med* 333(12): 797-798, 1995
- ¹⁰⁵ *Rettig MB, Ma HJ, et al.*: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of bone marrow dendritic cells from multiple myeloma patients. *Science* 276: 1851-1854, 1997
- ¹⁰⁶ *Tarte K, Olsen SJ, et al.*: Clinical-grade functional dendritic cells from patients with multiple myeloma are not infected with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Blood* 91(6): 1852-1857, 1998
- ¹⁰⁷ *Agbalika F, Mariette X, et al.*: Detection of human herpesvirus-8 DNA in bone marrow biopsies from patients with multiple myeloma and Waldenström's macroglobulinemia. *Blood* 91(11): 4393-4394, 1998
- ¹⁰⁸ *Rady PL, Yen A, et al.*: Herpesvirus-like DNA sequences in non-Kaposi's sarcoma skin lesions of transplant patients. *Lancet* 345: 1339-1340, 1995
- ¹⁰⁹ *Huh J, Kang GH, et al.*: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in Kikuchi's disease. *Hum Pathol* 29: 1091-1096, 1998
- ¹¹⁰ *Katano H, Suda T, et al.*: Human herpesvirus 8-associated solid lymphomas that occur in AIDS patients take anaplastic large cell morphology. *Mod Pathol* 13(1): 77-85, 2000
- ¹¹¹ *Chan C-C, Shen DF, et al.*: Detection of human herpesvirus-8 and Epstein-Barr virus DNA in primary intraocular lymphomas. *Blood* 93(8): 2749-2751, 1999
- ¹¹² *Corboy JR, Garl PJ, et al.*: Human herpesvirus 8 DNA in CNS lymphomas from patients with and without AIDS. *Neurology* 50(2): 335-340, 1998
- ¹¹³ *O'Leary J, Kennedy M, et al.*: Cellular localisation of HHV-8 in Castleman's disease: is there a link with lymph node vascularity? *J Clin Pathol: Mol Pathol* 53: 69-76, 2000

-
- ¹¹⁴ *Mesri EA, Cesarman E, et al.*: Human herpesvirus-8/ Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a new transmissible virus that infects B cells. *J Exp Med* 183: 2385-2390, 1996
- ¹¹⁵ *Dupin N, Diss TC, et al.*: HHV-8 is associated with a plasmablastic variant of Castleman disease that is linked to HHV-8-positive plasmablastic lymphoma. *Blood* 95(4): 1406-1412, 2000
- ¹¹⁶ *Luppi M, Barozzi P, et al.*: Human herpesvirus-8 DNA sequences in human immunodeficiency virus-negative angioimmunoblastic lymphadenopathy and benign lymphadenopathy with giant germinal center hyperplasia and increased vascularity. *Blood* 87(9): 3903-3909, 1996
- ¹¹⁷ *Decker LL, Shankar P, et al.*: The Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) is present as an intact latent genome in KS tissue but replicates in the peripheral blood mononuclear cells of KS patients. *J Exp Med* 184: 283-288, 1996
- ¹¹⁸ *Thomas JA, Brookes LA, et al.*: HHV8 DNA in normal gastrointestinal mucosa from HIV seropositive people. *Lancet* 347: 1337-1338, 1996
- ¹¹⁹ *Diamond C, Brodie SJ, et al.*: Human herpesvirus 8 in the prostate glands of men with Kaposi's sarcoma. *J Virol* 72(7): 6223-6227, 1998
- ¹²⁰ *Monini P, Lellis L d., et al.*: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus DNA sequences in prostate tissue and human semen. *N Engl J Med* 334: 1168-1172, 1996
- ¹²¹ *Blackbourn DJ, Lennette ET, et al.*: Human herpesvirus 8 detection in nasal secretions and saliva. *J Infect Dis* 177(1): 213-216, 1998
- ¹²² *Dupin N, Grandadam M, et al.*: Herpesvirus-like DNA sequences in patients with mediterranean Kaposi's sarcoma. *Lancet* 345: 761-762, 1995
- ¹²³ *Saiki RK, Chano CA, et al.*: Diagnosis of sickle cell anemia and β -thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N Engl J Med* 319: 537-541, 1988.
- ¹²⁴ *Moore PS, Kingsley LA, et al.*: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection prior to onset of Kaposi's sarcoma. *AIDS* 10(2): 175-180, 1996
- ¹²⁵ GenBank Database Document Reader, www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/birx_doc?genbank, 03.06.1998
- ¹²⁶ *Angerer LM, Stoler MH, et al.*: *In situ* hybridization with RNA probes: An annotated recipe. In: *In situ* Hybridization, ed. Valentino KL *et al.*, Oxford Univ. Press, S. 42-70, 1987

-
- ¹²⁷ *Milani S, Herbst H, et al.*: In situ hybridization for procollagen types I, III, and IV mRNA in normal and fibrotic rat liver: evidence for predominant expression in non-parenchymal liver cells. *Hepatology* 10: 84-92, 1989
- ¹²⁸ *Sambrook J, Fritsch EF, et al.*: Analysis and cloning of eukaryotic genomic DNA. In: *Molecular cloning*, eds. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition, 1989
- ¹²⁹ *Jat P, Arrand JR*: *In vitro* transcription of two Epstein-Barr virus specified small RNA molecules. *Nucleic Acid Res* 10: 3407-3425, 1982
- ¹³⁰ *Williamson DJ*: Specificity of riboprobes for intracellular RNA in hybridization histochemistry. *J Histochem Cytochem* 36(7): 811-813, 1988
- ¹³¹ *Foss HD, Herbst H, et al.*: Patterns of cytokine gene expression in infectious mononucleosis. *Blood* 83: 707-712, 1994
- ¹³² *Höfler H, Pütz B, et al.*: Simultaneous localization of calcitonin mRNA and peptid in a medullary thyroid carcinoma. *Virchows Arch B54*: 144-151, 1987
- ¹³³ *Cordell JL, Falini B, et al.*: Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immunocomplexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 32: 219-229, 1984
- ¹³⁴ *Stein H, Gatter K, et al.*: Use of freeze-dried paraffin-embedded sections for immunohistological staining with monoclonal antibodies. *Lab Invest* 52: 676-683, 1985
- ¹³⁵ *Flore O, Rafii S, et al.*: Transformation of primary endothelial cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus 8. *Nature* 394: 588-592, 1998
- ¹³⁶ *Frizzera G*: Atypical Lymphoproliferative Disorders. In: Knowles DM (ed): *Neoplastic Hematopathology*. 2nd edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, S. 595-607, 2001
- ¹³⁷ *Oksenhendler E, Boulanger E, et al.*: High incidence of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus-related non-Hodgkin lymphoma in patients with HIV infection and multicentric Castleman disease. *Blood* 99(7): 2331- 2336, 2002
- ¹³⁸ *Chadburn A, Hyjek E M, et al.*: Immunophenotypic analysis of the Kaposi sarcoma herpesvirus (KSHV; HHV-8)-infected B cells in HIV+ multicentric Castleman disease (MCD). *Histopathology* 53(5): 513-524, 2008
- ¹³⁹ *Dittmer D, Lagunoff M, et al.*: A cluster of latently expressed genes in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 72(10): 8309-15, 1998

-
- ¹⁴⁰ *Ballestas ME, Chatis PA, et al.*: Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen. *Science* 284: 641-644, 1999
- ¹⁴¹ *Sarid R, Flore O, et al.*: Transcription mapping of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genome in a body cavity-based lymphoma cell line (BC-1). *J Virol* 72: 1005-1012, 1998
- ¹⁴² *Aoki Y, Yarchoan R, et al.*: Detection of viral interleukin-6 in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-linked disorders. *Blood* 97(7): 2173-2176, 2001
- ¹⁴³ *Chiou C-J, Poole LJ, et al.*: Patterns of expression and transactivation function exhibited by the vGCR (ORF74) chemokine receptor protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 76: 3421-3439, 2002
- ¹⁴⁴ *Moore MAS*: The Hematopoietic System and Hematopoiesis. In: Knowles DM (ed): *Neoplastic Hematopathology*. 2nd edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, S. 26, 2001
- ¹⁴⁵ *Hsu SM, Waldron JA, et al.*: Expression of interleukin-6 in Castleman's disease. *Hum Pathol* 24:833-839, 1993
- ¹⁴⁶ *Nishimoto N, Sasai M, et al.*: Improvement in Castleman's disease by humanized anti-interleukin-6 receptor antibody therapy. *Blood* 95(1):56-61, 2000
- ¹⁴⁷ *Chatterjee M, Osborne J, et al.*: Viral interleukin-6-induced cell proliferation and immune evasion of interferon activity. *Science* 298: 1432-1435, 2002
- ¹⁴⁸ *Foss HD, Araujo I, et al.*: Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Lymphomas and Castleman's Disease. *J Pathol* 183: 44-50, 1997
- ¹⁴⁹ *Mori Y, Nishimoto N, et al.*: Human herpesvirus 8-encoded interleukin-6 homologue (viral IL-6) induces endogenous human IL-6 secretion. *J Med Virol* 61(3): 332-335, 2000
- ¹⁵⁰ *Liu C, Okuzhnov Y, et al.*: Human herpesvirus 8 (HHV-8)-encoded cytokines induce expression of and autocrine signaling by vascular endothelial growth factor (VEGF) in HHV-8-infected primary-effusion lymphoma cell lines and mediate VEGF-independent antiapoptotic effects. *J Virol* 75: 10933-10940, 2001
- ¹⁵¹ *Friberg J, Jr, Kong W, et al.*: p53 inhibition by the LANA protein of KSHV protects against cell death. *Nature* 402: 889-894, 1999
- ¹⁵² *Radkov SA, Kellam P, et al.*: The latent nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus targets the retinoblastoma-E2F pathway and with the oncogene Hras transforms primary rat cells. *Nat Med* 6: 1121-1127, 2000

-
- ¹⁵³ *An J, Lichtenstein AK, et al.*: The Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) induces cellular interleukin 6 expression: role of the KSHV latency-associated nuclear antigen and the AP1 response element. *Blood* 99(2): 649-654, 2002
- ¹⁵⁴ *Lee BJ, Koszinowski UH, et al.*: A gammaherpesvirus G protein-coupled receptor homologue is required for increased viral replication in response to chemokines and efficient reactivation from latency. *J Immunol* 170: 243-251, 2003
- ¹⁵⁵ *Pati S, Cavrois M, et al.*: Activation of NF- κ B by the human herpesvirus 8 chemokine receptor ORF74: Evidence for a paracrine model of Kaposi's sarcoma pathogenesis. *J Virol* 75: 8660-8673, 2001
- ¹⁵⁶ *Montaner S, Sodhi A, et al.*: Endothelial infection with KSHV genes in vivo reveals the vGPCR initiates Kaposi's sarcoma-genesis and can promote the tumorigenic potential of viral latent genes. *Cancer Cell* 3: 23-36, 2003
- ¹⁵⁷ *Liu L, Eby MT, et al.*: The human herpes virus 8-encoded viral FLICE inhibitory protein physically associates with and persistently activates the NFkappa B kinase complex. *J Biol Chem* 277: 13745-13751, 2002
- ¹⁵⁸ *Suda T, Katano H, et al.*: HHV-8 infection status of AIDS-unrelated and AIDS-associated multicentric Castleman's disease. *Pathol Int* 51(9): 671-679, 2001
- ¹⁵⁹ *Boivin G, Cote S, et al.*: Quantification of human herpesvirus 8 by real-time PCR in blood fractions of AIDS patients with Kaposi's sarcoma and multicentric Castleman's disease. *J Med Virol* 68(3): 399-403, 2002
- ¹⁶⁰ *Dupin N, Krivine A, et al.*: No effect of protease inhibitor on clinical and virological evolution of Castleman's disease in an HIV-1 infected patient. *AIDS* 11: 1400-1401, 1997
- ¹⁶¹ *Zietz C, Bogner JR, et al.*: An unusual cluster of cases of Castleman's disease during highly active antiretroviral therapy for AIDS. *N Engl J Med* 340: 1923-1924, 1999
- ¹⁶² *Horster S, Jung C, et al.*: AIDS, Multicentric Castleman's Disease, and Plasmablastic Leukemia: Report of a Long-Term Survival. *Infection* 32(5): 296-298, 2004
- ¹⁶³ *Yamamoto T, Osaki T, et al.*: Immunological investigation of adult patients with primary herpes simplex virus-1 infection. *J Oral Pathol Med* 22: 263, 1993
- ¹⁶⁴ *Callan MFC, Steven N, et al.*: Large clonal expansions of CD8+ T cells in acute infectious mononucleosis. *Nature* 2: 209-211, 1996

¹⁶⁵ *Schattner EJ, Casali P*: The Immune System: Structure and Function. In: Knowles DM (ed): Neoplastic Hematopathology. 2nd edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, S. 63-71, 2001

7 Anhang

7.1 Reagenzien und Lösungen

Reagenzien und Lösungen für die Polymerase Kettenreaktion

-*Aqua dest.*

-Ethanol (unvergällt, Hausmarke)

-Xylol (Hausmarke)

-ATL Puffer (QIAmp® DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden, D)

-Proteinase K (QIAmp® DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden, D)

-AL Puffer (QIAmp® DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden, D)

-AW Puffer (QIAmp® DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden, D)

-AE Puffer (QIAmp® DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden, D)

-*AmpliTaq*® DNA Polymerase (Perkin Elmer, Branchburg, USA)

-*GeneAmp*® 10x PCR Puffer: 100mM Tris-HCl, pH 8.3; 500mM KCl; 15mM MgCl₂; 0,01% (w/v) Gelatine (Perkin Elmer, Branchburg, USA)

-dNTP (Boehringer, Mannheim, D)

-25mM MgCl₂ (Perkin Elmer, Branchburg, USA)

-1x TBS: 8,7g NaCl zu 1000ml 0,05M Tris-HCl kombinieren mit 8,7g NaCl in 1000ml Tris- Base bis pH 7,6 erreicht ist

-6% Acrylamid (Appligene, Illkirchen Graffenstaden, F)

-10x TBE: 108g Tris-Base, 55g Borsäure (Karl Roth, Karlsruhe, D) und 8,3g EDTA ad 1l H₂O (Braun, Melsungen, D)

-Ethidiumbromid: 30µl 1%ige Stammlösung (Serva, Heidelberg; D) auf 100ml TBE-Puffer

Reagenzien und Lösungen für die Herstellung der cRNA Sonden

-*Aqua bidest.*

-Depc (Diethylpyrocarbonat, Sigma, Deisenhofen, D)

-Depc-H₂O: auf 500ml *Aqua bidest.* 0,1ml Depc, gut schütteln, 1 Std. inkubieren, autoklavieren

-[³⁵S]-UTP (37MBq, New England Nuclear: Du Pont NEN, Boston, Massachusetts, USA)

-RNA Polymerasen Sp6, T3 und T7 (GIBCO-BRL, Eggenstein, D)

-5x Transkriptionspuffer (GIBCO-BRL, Eggenstein, D)

- 3x rNTP: je 1µl ATP, CTP und GTP aus 100mM Stammlösung (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sv) in 7µl Depc-H₂O lösen
- RNAsin Placental Ribonuclease (Promega, Madison, Wisconsin, USA)
- DNaseI, RNase frei (Promega, Madison, Wisconsin, USA)
- Hefe (yeast)-t-RNA: 50mg y-t-RNA (GIBCO-BRL, Eggenstein, D) in 1ml Depc-H₂O lösen, in 10µl-Aliquots bei -20°C lagern
- Ethanol (vergällt, Hausmarke)
- Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol ultrapure (GIBCO-BRL, Eggenstein, D)
- 0,1M Dithiothreitol Stammlösung: 154mg DTT (Biomol, Hamburg, D), 10µl 0,5M EDTA und Depc-H₂O auf 10ml füllen, pH 6,0 einstellen, in 0,1ml Aliquots bei -20°C lagern
- 0,5M EDTA pH 8,0: 73,1g EDTA (Serva, Heidelberg, D) in 500ml *Aqua bidest.* lösen, NaOH-Plätzchen (Merck, Darmstadt, D) hinzugeben und rühren bis alles gelöst ist, mit 0,2ml Depc autoklavieren, pH 8 mit 1N NaOH einstellen
- 3M Natriumacetat pH 6: 24,61g NaAc (Merck, Darmstadt, D) in 100ml *Aqua bidest.*, mit Essigsäure (Merck, Darmstadt, D) pH 6,0 einstellen, 0,1ml Depc hinzugeben, autoklavieren
- 1M Natriumhydrogencarbonat: 0,84g NaHCO₃ (Merck, Darmstadt, D) in 10ml Depc-H₂O lösen, zu 1ml aliquotieren
- 1M Natriumcarbonat pH 10,2: 1,06g Na₂CO₃ (Merck, Darmstadt, D) in 10ml Depc-H₂O lösen, pH 10,2 mit Natriumhydrogencarbonat einstellen, in 1ml Aliquots lagern
- Hydrolysepuffer (80mM NaHCO₃/120mM Na₂CO₃/10mM DTT) : 50µl (pro 50µl Sondenansatz) enthalten 4µl 1M NaHCO₃, 6µl 1M Na₂CO₃, 5µl 0,1M DTT und 34,5µl Depc-H₂O
- Stoppuffer (0,2M NaAc/1% Essigsäure/10mM DTT) : 100µl (pro 100µl Sondenansatz) enthalten 6,6µl 3M NaAc pH 6, 1µl 100% Essigsäure, 10µl 0,1M DTT und 82,4µl Depc-H₂O

Reagenzien und Lösungen für die Behandlung der Paraffinschnitte vor der Hybridisierung

- Aceton (Hausmarke)
- APES (Aminopropyltriethoxysilane, Sigma, Deisenhofen, D)
- Ethanolreihe (30%, 70%, 90%, 100% mit Depc-H₂O verdünnt)
- Essigsäureanhydrid p.a. (Merck, Darmstadt, D)

-10x PBS (1,3M NaCl/70mM Na₂HPO₄/30mM NaH₂PO₄) pH 7,2: 2,6g NaH₂PO₄ (Merck, Darmstadt, D), 6,22g Na₂HPO₄ (Merck, Darmstadt, D) und 38g NaCl (Merck, Darmstadt, D) in 500ml *Aqua bidest.* lösen, 0,2ml Depc inkubieren und autoklavieren; pH 7,2 mit 1N NaOH einstellen

-4% PFA/1x PBS pH 7,0: 20g Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, D) in 500ml 1x PBS (50ml 10x PBS mit 450ml Depc-H₂O) auf der Heizplatte bei 70°C so lange rühren bis die Lösung klar ist, pH 7,0 mit 1N NaOH oder HCl einstellen

-0,2N Salzsäure: 100ml 1N HCl (Merck, Darmstadt, D) *ad* 500ml Depc-H₂O

-Pronase: 1g Pronase (Roche, Mannheim, D) wird in 8ml Depc-H₂O (125mg/ml) gelöst und 4 Stunden bei 37°C im Wasserbad vorverdaut, d.h. kontaminierende Enzyme werden zerstört, die Lösung wird aliquotiert, lyophilisiert und bei -20°C gelagert; zum Gebrauch wird mit 1x PBS pH 7,2 eine Endkonzentration von 0,5mg/ml hergestellt.

-0,1M Glycin/1x PBS pH 7,4: 37,5g Glycin (Serva, Heidelberg, D) *ad* 500ml 1x PBS, 0,2ml Depc hinzugeben, inkubieren und autoklavieren; pH 7,4 mit NaOH einstellen, im Kühlschrank lagern

-0,1M Triethanolamin pH 8,0: 1,33ml Triethanolamin Base (Sigma, Deisenhofen, D) in 80ml Depc-H₂O lösen, pH 8 mit 1N HCl einstellen, auf 100ml mit Depc-H₂O auffüllen

Reagenzien und Lösungen für die Hybridisierung

-Formamid, ionisiert (Merck, Darmstadt, D)

-Formamid, deionisiert pH 7,0: 400ml Formamid mit 50g Ionenaustauscher AG 501 X8 D Resin (BioRad, Richmond, Kalifornien, USA) deionisieren, pH prüfen, ggf. mit neuem Austauscherharz wiederholen, steril filtrieren, in 1ml-Aliquots bei -20°C lagern

-5M NaCl: 146g NaCl (Merck, Darmstadt, D) in 500ml *Aqua bidest.* lösen, 0,2ml Depc zugeben, autoklavieren

-1M Tris-HCl: 79g Tris-HCl (Sigma, Deisenhofen, D) in 500ml Depc-H₂O lösen

-1M Tris-Base: 60,7g Tris-Base (Sigma, Deisenhofen, D) in 500ml Depc-H₂O lösen, beide Tris- Lösungen mischen bis gewünschter pH-Wert erreicht ist

-1M NaPO₄ pH 6,8: mischen aus 1M NaH₂PO₄ und 1M Na₂HPO₄ bis pH 6,8 erreicht ist, 0,2ml Depc zugeben, autoklavieren

- 100x Denhardt's Lösung: 0,2g Ficoll 400 (Sigma, Deisenhofen, D), 0,2g Polyvinylpyrrolidone (PVP, Sigma, Deisenhofen, D), 0,2g BSA Fraktion V in Depc-H₂O ad 10ml lösen, durch Miliporefilter filtrieren, zu 1ml aliquotieren
- 10x Salze: 500ml 10x Salze setzen sich aus 300ml 5M NaCl, 50ml 1M Tris-HCl pH 7,5, 50ml 1M NaPO₄ pH 6,8, 50ml 0,5M EDTA pH 8,0, 45ml Depc-H₂O und 5ml 100x Denhardt's zusammen
- 50% Dextransulfat: 25g DexSO₄ (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sv) in 25ml Depc-H₂O im Wasserbad bei 80°C lösen, vortexen, erneut 25ml Depc-H₂O zugeben, mixen, bei -20°C lagern
- Hybridisierungspuffer: 1ml enthalten 500µl deion. Formamid, 125µl 10xSalze, 100µl 0,1M DTT, 25µl Hefe-t-RNA und 250µl 50% Dextransulfat
- Sondenmix: 100µl Sondenmix enthalten 50µl deion. Formamid, 10µl 0,1M DTT, 300.000cpm Aktivität pro OT in x µl und (40-x)µl Depc-H₂O
- Hybridisierungsgemisch: Hybridisierungspuffer und Sondenmix im Verhältnis 4:1

Reagenzien und Lösungen für das Posthybridisierungswaschen

- Posthybridisierungs- Waschlösung (50% Formamid/1x Salze/10mM DTT): 1000ml Waschlösung enthalten 500ml deion. Formamid, 100ml 10x Salze, 1,6g DTT und deionisiertes H₂O
- RNase A: 100mg RNase A (Roche, Mannheim, D) in 10ml Depc-H₂O lösen, zu 1ml aliquotieren, 2 min im Wasserbad bei 100°C kochen, damit kontaminierende Enzyme zerstört werden, bei -20°C lagern
- 10xTES pH 7,5: 1000ml 10xTES besteht aus 100ml 1M Tris-HCl pH 7,5, 20ml 0,5M EDTA, 289g NaCl und deionisiertem H₂O, pH kontrollieren
- 20xSSC pH 7,0: 1000ml 20xSSC enthalten 175g NaCl und 88g Trinatriumcitratdihydrat (Na₃-Citrat, Merck, Darmstadt, D) in deionierten H₂O
- 7,5M Ammoniumacetat pH 7,5: 57,8g NH₄-Acetat (p.a. Merck, Darmstadt, D) in 100ml *Aqua deion.* lösen, pH 7,5 mit Essigsäure einstellen

Reagenzien und Lösungen für die Autoradiographie

- G5 Fotoemulsion (Ilford, Mobberley, GB)
- Calciumchlorid gekörnt (CaCl₂, Merck, Darmstadt, D)

Reagenzien und Lösungen für die Entwicklung

- Entwickler D 19 (Eastman Kodak, Rochester, New York, USA) verdünnt mit *Aqua dest.* auf 50%
- Fixierer 3000 Lösung A (Eastman Kodak, Rochester, New York, USA) verdünnt mit *Aqua dest.* auf 25%

Reagenzien und Lösungen für die HE-Färbung

- Meyer's Hämalanlösung (Merck, Darmstadt, D)
- Eosin Y (Sigma, Deisenhofen, D)
- Kaiser's Glyceringelatine (Merck, Darmstadt, D)

Reagenzien und Lösungen für die einfache radioaktive *in situ* Hybridisierung mit *Micrococcus nuclease* und DNaseI

- 1mg/ml *Micrococcus nuclease* (Roche, Mannheim, D) gelöst in 10µl 1M Tris-HCl pH 8,8, 1µl 1M CaCl₂ und 989µl Depc-H₂O
- 500µg/ml DNaseI (Promega, Madison, Wisconsin, USA)
- Lachssperma (Roche, Mannheim, D)
- 1M Calciumchlorid: 7,5533g CaCl₂ (Sigma, Deisenhofen, D) *ad* 100ml Depc-H₂O
- 1M Magnesiumchlorid: 5,9765g MgCl₂ (Merck, Darmstadt, D) *ad* 100ml Depc-H₂O
- Micrococcus nuclease*-Lösung: 1ml *Micrococcus nuclease*-Lösung enthält 10µl 1M Tris-HCl pH 8,8, 1µl 1M CaCl₂, 50µl 1mg/ml *Micrococcus nuclease* und 939µl Depc-H₂O
- DNaseI-Lösung: 1ml DNaseI-Lösung enthält 50µl 1M Tris-HCl pH 7,5, 10µl 1M MgCl₂, 200µl 500µg/ml DNaseI und 740µl Depc-H₂O
- Waschlösung: 100ml Waschlösung bestehen aus 1ml 1M Tris-HCl pH 7,5, 0,4ml 0,5M EDTA und 98,6ml Depc-H₂O
- Hybridisierungsgemisch: 200µl Hybridisierungsgemisch enthalten 100µl deion. Formamid, 0,4µl 0,5M EDTA, 24µl 5M NaCl, 2µl 1M Tris-HCl pH 7,5, 8µl 50% Dextransulfat, 2µl 10,2mg/ml Lachssperma, 4µl 50mg/ml Hefe-t-RNA, 40µl 0,1M DTT, 500.000cpm Sonde in x µl und (19,6-x)µl Depc-H₂O

Reagenzien und Lösungen für die einfache nicht radioaktive *in situ* Hybridisierung

- Sondenmix: 100µl Sondenmix enthalten 50µl deion. Formamid, 4µl EBER 1 Sonde, 4µl EBER 2 Sonde und 42µl Depc-H₂O
- 10x TBS (0,5M Tris/1,5M NaCl) pH 7,6: 87g NaCl in 0,5M Tris-HCl und 87g NaCl in 0,5M Tris-Base lösen, beides kombinieren bis pH 7,6 erreicht ist
- RPMI 1640 (1x konz., Seromed, D) pH 7,5 mit Tris-Base einstellen
- F_{ab}- Fragment (anti-Digoxigenin, Roche, Mannheim, D) , 1:200 mit 1x RPMI verdünnt
- 10x APAAP Entwicklungspuffer (E-Puffer, 0,5M Tris/1,5M NaCl) pH 8,8: siehe 10x TBS
- 0,2M 2-Amino-2-Methyl-1,3-Propandiol (Merck, Darmstadt, D)
- Levamisole (Sigma, Deisenhofen, D)
- Naphthol-AS-Biphosphat (Sigma, Deisenhofen, D)
- N,N-Dimethylformamid (DMF, Merck, Darmstadt, D)
- Natriumnitrit (NaNO₃, Sigma, Deisenhofen, D)
- Neufuchsin Stammlösung: 5g Neufuchsin (Merck, Darmstadt, D) in 100ml 2N HCl lösen, in dunkler Flasche bei 4°C lagern
- Lösung A (100ml): 70ml 1x E-Puffer, 25ml Propandiol und 40mg Levamisole
- Lösung B (100ml): 50mg Na-AS-Bi-P in 0,6ml DMF lösen
- Lösung C (100ml): 20mg NaNO₃, 0,5ml *Aqua dest.* und 0,2ml Neufuchsin
- Lösung C in Lösung A geben, mischen, Lösung B dazu, pH 8,8 mit 2N HCl einstellen, filtrieren, pH kontrollieren, sofort verwenden

Reagenzien und Lösungen für die sequentielle APAAP-IH und radioaktive ISH

- Hefe (Yeast, 50mg/ml)
- Humanserum
- R1: 1ml 1x RPMI und 50µl Hefe, zur Verdünnung der primären Antikörper und des APAAP-Komplexes (Maus anti-alkalische Phosphatase-AK und alkalischer Phosphatase)
- R2: 900µl R1 und 100µl Humanserum, zur Verdünnung des Brückenantikörpers (Kaninchen anti-Maus AK)

Reagenzien und Lösungen für die sequentielle Peroxidase IH und radioaktive

ISH

-30% Wasserstoffperoxid (H_2O_2 , Merck, Darmstadt, D)

-EPOS-System (DAKO, Hamburg, D)

-Diaminobenzidin (DAB, DAKO, Hamburg, D)

7.2 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APAAP	Alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase
APES	Aminopropyltriethoxysilane
<i>Aqua dest.</i>	Destilliertes Wasser (<i>Aqua destillata</i>)
BLIMP1	B-Lymphozyten induziertes Maturation Protein 1
BSA	Rinderserum Albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	Komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
cpm	Zählrate pro Minute (<i>counts per minute</i>)
cRNA	Komplementäre RNA (<i>complementary RNA</i>)
DAB	Diaminobenzidin
Depc	Diethylpyrocarbonat
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EBER	EBV kodierte RNA (<i>EBV encoded RNA</i>)
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EPOS	Enhanced Peroxidase One-Step Staining
FDC	Follikuläre dendritische Zelle (<i>follicular dendritic cell</i>)
HHV 8	Humanes Herpesvirus 8
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
IH	Immunhistologie
Ig	Immunglobulin
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
kb	Kilobasen
KS	Kaposi Sarkom

KSHV	Kaposi Sarkom-assoziiertes Herpesvirus (<i>Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus</i>)
M.	Morbus
MC	Morbus Castleman
MCD	<i>Multicentric Castleman's disease</i>
MZ	Mantelzone
OT	Objektträger
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
RE	Restriktionsenzym
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNaseA	Ribonuklease Typ A
RNAsin	Ribonuklease Inhibitor
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute-Medium
RT	Raumtemperatur
SSC	Kochsalz/Natriumzitat-Puffer (<i>standard saline citrate</i>)
t-RNA	Transfer-Ribonukleinsäure
vCyclin	virales Cyclin D1
vFLIP	<i>viral fas-ligand ICE inhibitory protein</i>
vGPCR	<i>viral G-protein coupled receptor</i>
vIL-6	virales Interleukin 6
vLANA	<i>viral latency associated nuclear antigen</i>
vMCP 1	<i>viral major capsid protein</i>
vMIP-1 α	<i>viral macrophage inflammatory protein</i>

7.3 Danksagung

Ich danke ganz herzlich Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. H. Stein für die freundliche Überlassung des Themas am Institut für Pathologie.

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. habil. Hans-Dieter Foß für die freundliche Überlassung des Themas sowie die gute und vor allem ausdauernde Unterstützung während der Durchführung der Arbeit. Ohne sein Engagement wäre diese Arbeit nicht in der vorliegenden Form zustande gekommen.

Frau Dr. Gudrun Demel danke ich für die gute Zusammenarbeit und die wertvolle Beratung bei methodischen Fragestellungen.

Für die sehr gute technische Unterstützung möchte ich mich besonders bei Frau Erika Berg, Herrn Lutz Oehring und Herrn Hennig Müller bedanken.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie des UKBF bedanke ich mich für die Hilfsbereitschaft und die Unterstützung.

Ich danke besonders meinem Mann Florian Reichenberger, der mir immer wieder den Rücken gestärkt und mich ermutigt hat, und mir geholfen hat, mich in der Welt der Computer zurecht zu finden.

7.4 Lebenslauf

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

7.5 Selbstständigkeitserklärung

„Ich, Franziska Reichenberger, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Genexpressionsmuster und Phänotypisierung der Kaposi-Sarkom Virus-infizierten Zellen beim Morbus Castleman“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

05.05.2010