

## **7. Anhang**

### **7.1. Geräte**

Kühltruhe (-80°C)

Kryostat (Reichert-Jung, 2800 Frigocut E)

Microtom (Microm GmbH, Heidelberg, Typ 4008)

Hydraulischer Mikromanipulator (NIKON)

Thermocycler (TC 9600 Perkin Elmer)

Arbeitsbanken mit laminar flow

Automatischer DNA-Sequenzer (Perkin Elmer; 373A, 377A)

### **7.2. Lösungen**

#### **7.2.1 Reagenzien für die Immunhistologie**

##### **Aceton**

J. T. Baker 8003

##### **Calcium-Chlorid**

Merk 102 389 100

##### **Xylol**

J. T. Baker 8118

##### **Spülpuffer Tris 5 l**

34,25 g Tris HCl (GibcoBRL, 15506-017); 4,5 g Tris Base (Sigma, T1503); 43,9 g NaCl (Merck 1.06404.1000); auf 5 l Aqua dest.; pH 7,4-7,6. Für die Färbung von Paraffinmaterial wird zu 5 l Trispuffer 5 ml Tween hinzugegeben. Dadurch sinkt die Oberflächenspannung

##### **RPMI- Verdünnung für Antikörper**

RPMI (Seromed 1640;10-fach konz.) 50 ml; 450 ml Aqua dest; 50 ml inaktiviertes Rinderserum, 0,5 g Azid (Natriumsalz Merck 6688); pH 7,4-7,6

##### **Entwicklungspuffer**

8,7 g NaCl (Merck 6404); 1,5 g Tris HCl (Sigma T-3253); 4,9 g Tris-Base (Sigma T-1503) in 1 l Aqua dest lösen

##### **Propandiol**

21 g 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol (Merck 801464)  
auf 1l Aqua dest.

##### **Neufuchsin**

5 g Neufuchsin (Merck 4040) in 100 ml 2 N HCl, dunkel und kühl lagern

##### **Entwicklerlösung**

###### Lösung A

62,5 ml Propandiol und 100 mg Levamisole (Sigma L-9756) in 175 ml Entwicklungspuffer

###### Lösung B

125 mg Naphtol-As-Bi-Phosphat (Sigma N-2250) in 1500 µl DMF (Merck 3034)

### Lösung C

50 mg Natriumnitrit (Merck 102 F-0220) in 1250 µl Aqua dest, danach 500 µl Neufuchsin hinzugeben. Diese Lösung muß eine Minute reagieren. Lösung B wird zuerst in Lösung A danach Lösung C hinzugeben. Der pH 8,8 wird eingestellt, die Lösung filtriert. Die Entwicklerlösung darf nicht älter als 10 Minuten sein, wenn die zu entwickelnden Schnitte 20 Minuten auf dem Schüttler inkubiert werden.

### **Hämalaun**

1 g Hämatoxylin (Merck 4305); 0,2 g NaJO<sub>3</sub> (Merck 6525); 50 g Kalilaun (Merck 507 A 95744) in 1 l Aqua dest lösen und über Nacht rühren, danach 50 g Chloralhydrat (Merck 2425) und 1 g Zitronensäure (Merck 244) hinzugeben

### **Kaisers Glycerin-Gelatine**

(Merck 9242)

### **Citratpuffer 0,01m**

10,5 g Citronensäure-Monohydrat (Merck 100244) in 5 l Aqua dest

### **Fastred**

DAKO K0507

## **7.2.2. Reagenzien für die in situ-Hybridisierung**

### **DEPC 0,1 %**

1 ml Diethylpyrocarbonat (Sigma D5758) auf einen Liter Milliporewasser in autoklavierte Flaschen unter dem Abzug eine Nacht stehen lassen, danach autoklavieren.

### **1 N HCl**

Merck 109057100

### **PBS-Puffer 10 x**

2,6 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O; 6,22 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O; 38 g NaCl auf 500 ml Aqua dest, DEPC hinzugeben (1 ml auf 1 Liter), autoklavieren, pH 7,2 einstellen mit NaOH

### **Glycin 1M**

7,5 g Glycin (Serva 23390) auf 100 ml 1xPBS, pH 7,4

### **10xSalze**

60 ml 5M NaCl DEPC; 10 ml 1M Tris DEPC pH 6,8; 10 ml 1M NaPO<sub>4</sub> DEPC pH 6,8; 10 ml 0,5 M EDTA DEPC pH 8,0; 9 ml H<sub>2</sub>O DEPC; 1 ml 100xDenhardts (0,2 g Ficoll 400; 0,2 g Polyvinylpyrrolidone; 0,2 g BSA Gentax Fraktion V, in 10 ml H<sub>2</sub>O DEPC lösen, sterifiltrieren)

### **Hybridisierungsmix**

20 µl Formamid (Merck 1.09684.2504)

5 µl 10xSalze

5 µl Dextransulfat (Fluka 31403)

2 µl Digoxigenin markierte Sonde gegen EBER

### **TES-Puffer**

10 ml 1M Tris HCl; 20 ml 0,5 M EDTA; 100 ml oder 289g 5M NaCl mit Milliporwasser auf 1000 ml auffüllen

**$\alpha$ -Dig- fab-Fragmente AP konjugiert**

Boehringer 1093274

**SSC 20x**

87,5g NaCl; 44,1 g tri-Na-Citrat, auf 500 ml Milliporewasser, pH 7,0

**Paraformaldehyd 4%**

20 g Paraformaldehyd (Merck 100405100) auf 500 ml 1xPBS, bei 70 °C lösen bis die Lösung völlig klar ist, filtrieren pH einstellen auf 7,0

**Pronase**

Boehringer 165921

**Triethanolamin 0,1 M**

6,65 ml Triethanolamin (Sigma T1377) auf 450 ml DEPC H<sub>2</sub>O, pH 8,0 einstellen, mit DEPC H<sub>2</sub>O auf 500 ml auffüllen unmittelbar vor Gebrauch Essigsäureanhydrid (250  $\mu$ l / 100 ml) dazugeben.

**7.2.3. Reagenzien für die Mikromanipulation, PCR und Sequenzierung**

**Proteinase K**

Boehringer 745723

**Ampli-Taq-Gold Polymerase, Taq-Gold Puffer, Magnesium Dichlorid**

Perkin Elmer 8080100

**Desoxynucleosid-5`-Triphosphate**

0,8mM, Amersham 27-2035-01

**6% Polyacralamidgele**

H <sub>2</sub> O dest.	80ml
20xTBE	5ml
Acrylamid 40%	7,5ml (Gibco 35722-024)
Ammoniumpersulfat 10%	250 $\mu$ l (Bio-Rad 161-0700)
TEMED	20 $\mu$ l

**Ethidiumbromid**

Merck 1.11608.0030

**Mikrocentrifuge Filter**

Sartorius 13249-C-4G

**Big Dye-DNA-Sequenzierungskit**

Applied Biosystems 4303153

### 7.3. Abkürzungsverzeichnis

AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>
AILD	Angioimmunoblastische Lymphadenopathie mit Dysproteinämia
APAAP	alkalische Phosphatase anti alkalische Phosphatase
CBF	Charité- Universitätsmedizin Campus Benjamin Franklin
CD	<i>clusters of differentiation</i>
CDR2	<i>complementarity determining region</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	<i>desoxyribonucleinacid</i>
D-Segment	Diversity-Segment
EBNA	<i>EBV nuclear antigens</i>
EBER	<i>EBV encoded RNA</i>
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	<i>ethylene diamine tetra acetic acid</i>
FDC	Follikulär dendritische Zellen
FW3	<i>framework region</i>
Gp	Glykoprotein
IgH	Immunglobulinschwerkette
IgL	Immunglobulinleichtkette
IM	Infektiöse Mononukleose
J-Segment	<i>joining-Region</i>
LMP-1	<i>latent membran protein 1</i>
MALT	<i>mucosa associated lymphoid tissue</i>
mAK	monoklonaler Antikörper
N, N'	Zufällige Oligonukleotidsequenzen
Nd	nicht definiert
NFκB	nukleärer Transkriptionsfaktor κB
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
RNA	<i>ribonucleinacid</i>
RPMI	<i>Rosewell Park Memorial Institute medium</i>
rTPCR	reverse Transkriptase PCR
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>

TES	<i>Tris EDTA saline</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	<i>TNF-receptor-associated factor</i>
VBASE	<i>catalogue of human V gene segments and alleles</i>
V-Segment	variables Gensegment
ZEBRA	<i>BamHiz-encoded EBV replication trans-activator</i>