

Aus dem Institut für Humangenetik  
Fachbereich 2.6 Theoretische Medizin  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Untersuchungen zur Beteiligung viraler Synovialinfektionen  
an der Genese der Rheumatoiden Arthritis**  
*in situ*-Analyse viraler Nukleinsäuren und Proteine  
in arthritischer Synovialis

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der  
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
(2007)



vorgelegt von

**Carsten Lennerz**

geb. am 29.03.1978 in Saarbrücken



**Inhalt**

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Abstract</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung</b>	<b>13</b>
3.1	Rheumatoide Arthritis	13
3.1.1	Definition	13
3.1.2	Epidemiologie	13
3.1.3	Pathogenese und Histopathologie	13
3.1.4	Klinik	14
3.1.5	Diagnosekriterien	16
3.1.6	Diagnostik	16
3.1.7	Therapie	17
3.1.8	Ätiologie	19
3.1.8.1	Genetische (endogene) Faktoren	19
3.1.8.2	Exogene Faktoren (Umweltfaktoren)	21
3.2	Humanpathogene Viren mit Beteiligung in der Ätiologie bzw. Pathogenese der RA	25
3.2.1	Parvovirus B19	25
3.2.2	Das Parvovirus B19 im Kontext der Rheumatoiden Arthritis	27
3.2.3	Cytomegalievirus (CMV)	29
3.2.4	Das Cytomegalievirus im Kontext der Rheumatoiden Arthritis	30
3.2.5	Epstein-Barr Virus (EBV)	32
3.2.6	Das Epstein-Barr Virus als kausatives oder pathogenetisches Agens im Kontext der Rheumatoiden Arthritis	36
3.3	Fragestellung und Zielsetzung	39
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>41</b>
4.1	Gewebematerial	41
4.2	Positivkontrollen	43
4.2.1	EBV-Positivkontrollen	43
4.2.2	CMV-Positivkontrolle	43
4.2.3	Parvovirus B19-Positivkontrolle	43
4.3	Negativ-Kontrollen	43
4.4	Silanisierung von Objektträgern	44
4.5	DNase- und RNase-freies Arbeiten	44

4.5.1	DNase-freies Arbeiten	44
4.5.2	RNase-freies Arbeiten	44
4.6	<i>in situ</i> -Hybridisierung	45
4.6.1	EBER 1 und EBER 2-RNA- <i>in situ</i> -Hybridisierung	47
4.6.2	CMV-DNA- <i>in situ</i> -Hybridisierung	56
4.7	Immunhistochemie	59
4.8	Chromogenreaktionen	66
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>69</b>
5.1	Parvovirus B19-Untersuchungen	69
5.1.1	Nachweis einer synovialen Parvovirus B19-Infektion (IHC)	69
5.1.2	Zelltypcharakterisierung mittels Parvovirus B19-VP1/VP2 und CD3/CD20-Immundoppelfärbung	73
5.2	Cytomegalievirus (CMV)-Untersuchungen	75
5.2.1	Nachweis einer synovialen CMV-Infektion (DNA-ISH)	75
5.2.2	Zelltypisierung	76
5.2.3	Beurteilung des Aktivitätsgrades der Infektion	77
5.3	Epstein-Barr Virus (EBV)-Untersuchungen	79
5.3.1	Nachweis einer EBV-Infektion (EBER-ISH)	79
5.3.2	Charakterisierung der EBV-Infektionsphase	81
5.4	Metaanalyse einer koinzidenten Multivirusinfektion	85
5.5	Zusammenfassung der Kernergebnisse	88
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>89</b>
6.1	Parvovirus B19	89
6.1.1	Parvovirus B19-Infektionsnachweis in verschiedenen Arthritis-Entitäten	89
6.1.2	Fragliche Beeinflussung der Parvovirus B19-Ergebnisse durch Diagnose-inhärente Gewebecharakteristika	91
6.1.3	Beteiligung einer RA-typischen bzw. iatrogenen Immundefizienz	91
6.1.4	Beteiligung von Parvovirus B19 an der primären RA-Genese	92
6.1.5	Bedeutung von Parvovirus B19-Protein-Expression im RA-Geschehen	93
6.1.6	Methodische Aspekte des Parvovirus B19-Proteinnachweises	93
6.1.7	Charakterisierung der Parvovirus B19-positiven Zellen	94
6.1.8	Fragliche Parvovirus B19-Persistenz auch in normalem Synovialgewebe	95

---

6.2	Cytomegalievirus	96
6.2.1	Nachweis synovialer CMV-Präsenz in arthritischem Gewebe mit Überrepräsentation in der RA-Gruppe	96
6.2.2	Methodische Aspekte der eingesetzten <i>in situ</i> -Analyseverfahren; Beurteilung einer relevanten synovialen Infektion durch quantitative Analyse und Charakterisierung des CMV-infizierten Zelltyps	96
6.2.3	Beleg der Virusgenom-Integrität und der Potenz zur Replikation	97
6.2.4	Bestimmung und Beurteilung der viralen Aktivität	97
6.2.5	Mögliche Bedeutung einer persistierenden CMV-Infektion der Synovialis; Interaktion mit zellulären Mechanismen	98
6.2.6	Antigenstimulus durch Expression viraler Proteine	99
6.3	Epstein-Barr Virus	100
6.3.1	EBER-Nachweis in der RA/PSA-Gruppe versus rA/S-Kontrollgruppe	100
6.3.2	EBV-Infektion von Synovia lining-Zellen und Synovialfibroblasten	102
6.3.3	„Virale Aktivität“ bzw. Infektionszyklus der beobachteten synovialen EBV-Infektionen	102
6.3.4	Der LMP1-Nachweis / Methodische Aspekte	103
6.3.5	Mögliche Bedeutung von latenter EBV-Infektion bzw. LMP1-Expression	104
6.3.6	Grundsätzliche Einflussmöglichkeiten von EBV bei der RA	105
6.4	Zusammenfassung und Metaanalyse einer koinzidenten Multivirusinfektion	106
6.4.1	Koinzidente Mehrfachinfektionen	106
6.4.2	Effekte kombinierter Virusinfektionen	107
6.4.3	Generelle Aspekte von Virusinfektionen bei Immunsuppression	108
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>109</b>
<b>8</b>	<b>Publikationen/Dank</b>	<b>125</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>127</b>
	<b>Anhang</b>	<b>I</b>
	Abkürzungsverzeichnis	I
	Tabellen	III
	Puffer, Reagenzien und Großgeräte	VII
	Antikörper, Plasmide und Sonden	XI
	Protokollschemaschemata	XIII

## Abbildungen

Abbildung 1	Diagnostiksynopse der Rheumatoiden Arthritis (RA)	17
Abbildung 2	Beispiel der Parvovirus B19 VP1/VP2-IHC Parvovirus B19 positive fetale Niere bei Hydrops fetalis	26
Abbildung 3	Beispiele der EBER- <i>in situ</i> -Hybridisierung (ISH) an EBV-positiver Tonsille bei infektiöser Mononukleose (IM) und EBV-positivem Hodgkin Lymphom (HL)	35
Abbildung 4	schematische Darstellung des Vektors pBSJ1 mit klonierter EBER 1 cDNA	48
Abbildung 5	schematische Darstellung des Vektors pBSJ2 mit klonierter EBER 2 cDNA	48
Abbildung 6	Gelelektrophorese zur Überprüfung der Lineasierung	49
Abbildung 7	Gelelektrophorese zur semiquantitativen Abschätzung der EBER 1- bzw. EBER 2-Sondenkonzentration nach <i>in vitro</i> -Transkription im Vergleich zu t-RNA Proben definierter Konzentration	52
Abbildung 8	schematische Darstellung der Detektion der biotinylierten CMV-DNA Sonde post <i>in situ</i> -Hybridisierung über HRP-konjugiertes Streptavidin und additiver Tyramin Verstärkung	58
Abbildung 9	Schema der APAAP - Methode	61
Abbildung 10	schematische Darstellung der ABC Methode	64
Abbildung 11	schematische Darstellung der tyraminverstärkten ABC Methode	65
Abbildung 12	Parvovirus B19 IHC an Synovialgewebe	70
Abbildung 13	Immundoppelfärbung (Parvovirus B19 VP1/VP2 und T-Lymphotyten spezifisches CD3 bzw. B-Lymphozyten spezifisches CD20) an Synovialgewebeschnitten	74
Abbildung 14	CMV-Detektion an Synovialgewebe mittels CMV-DNA- <i>in situ</i> -Hybridisierung mit pp65-Sonde (unter Verwendung des APAAP-Systems)	76
Abbildung 15	CMV-Detektion an Synovialgewebe mittels CMV-DNA- <i>in situ</i> -Hybridisierung (unter Einsatz eines Tyraminverstärkungssystems)	77
Abbildung 16	Immunhistochemische Detektion des CMV-early Antigen (EA)	78
Abbildung 17	EBER1/2-RNA- <i>in situ</i> -Hybridisierung an Synovialgewebe	81
Abbildung 18	LMP1-Immunhistochemie am RA-Synovialgewebe	82

**Tabellen**

Tabelle 1	diagnostische Kriterien für die Klassifikation der chronischen Polyarthrites des American College of Rheumatologie (ACR, 1987)	16
Tabelle 2	Zusammensetzung des Untersuchungskollektivs nach klinischer Diagnose, Anzahl und Geschlecht	42
Tabelle 3	Übersicht der geschätzten Sondenkonzentrationen	52
Tabelle 4	Kombinationen der Doppelmarkierung	62
Tabelle 5	eingesetzte optimale Primäntikörperverdünnungen für IHC	63
Tabelle 6	eingesetzte Chromogen Enzym Kombinationen für IHC und ISH	67
Tabelle 7	Parvovirus B19 positive Synovialproben unterschiedlicher Arthritis-Entitäten	69
Tabelle 8	Übersicht über die 3 Klassen, die das unterschiedliche Ausmaß der Virusvermehrung repräsentieren	70
Tabelle 9	Semiquantitative Verteilung (Gruppe I – III) der Parvovirus B19- positiven Fälle absolut und aufgeschlüsselt nach den unterschiedlichen Arthritis Entitäten.	71
Tabelle 10	CMV-DNA positive Fälle nach unterschiedlichen Arthritis-Entitäten	75
Tabelle 11	CMV-EA-positive Fälle nach unterschiedlichen Arthritis-Entitäten	78
Tabelle 12	Auswertung EBER1/2 RNA-ISH nach Arthritis-Entitäten	80
Tabelle 13	Ergebnisse der EBV-Analysen in 23-EBER1/2-positiven Synovialproben (RA, PSA, rA/S, nS)	84
Tabelle 14	Synovialproben mit definitionsgemäß relevanter Virusinfektion aufgeschlüsselt nach Arthritis-Entität und Virustyp	85
Tabelle 15	Isolierte oder koinzidente, relevante Synovialinfektion durch EBV, CMV und/oder ParvoB19, differenziert nach verschiedenen Arthritis-Entitäten	87
Tabelle 16	detaillierte Darstellung des untersuchten Patientenkollektivs nach Fallnummer, Geschlecht, Alter, Präparatnummer und klinischer Diagnose	III
Tabelle 17	Übersicht über die Ergebnisse aller durchgeführten Virus-Analysen	V



*Gewidmet meinen Eltern*

*Änni und Hans-Jürgen Lennerz*



**Untersuchungen zur Beteiligung viraler Synovialinfektionen  
an der Genese der Rheumatoiden Arthritis**  
*in situ*-Analyse viraler Nukleinsäuren und Proteine  
in arthritischer Synovialis



# 1 Zusammenfassung

Die Rheumatoide Arthritis (RA) wird nach heutigem Kenntnisstand als multifaktoriell bedingte Erkrankung verstanden. Eine familiäre Krankheitshäufung sowie Beobachtungen aus Zwillingsstudien und eine Risiko-Korrelation mit bestimmten HLA-Allelen belegen eine endogene, d.h. eine genetische Komponente an der Genese der RA, erklären die Krankheitsentstehung jedoch nicht ausreichend. Neben der genetischen Prädisposition fanden hormonelle Einflussfaktoren sowie bakterielle und v.a. virale Infektionen als exogene, d.h. nicht genetisch determinierte Faktoren Einzug in die ätiologisch-pathogenetischen Krankheitskonzepte. Erste Assoziationen zwischen viraler Infektion und RA-Ätiogenese beruhen auf dem Nachweis erhöhter Serumantikörpertiter (u.a. Anti-EBV, Anti-CMV) bei Rheumapatienten. In neueren, PCR-basierten Analysen wurde Virus-DNA des EBV, CMV, Parvovirus B19 und Herpes simplex-Virus aus dem Synovialgewebe bzw. der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten amplifiziert. In Hinblick auf eine mögliche virale Beteiligung an der Krankheitsentstehung werden zwei sich nicht ausschließende Modelle diskutiert. Zum einen weisen Daten auf eine systemische Beteiligung mit pathomechanischer Induktion einer autoimmunologischen Reaktion bzw. immunologischen Kreuzreaktion hin. Zum anderen deutet der direkte Virusnachweis (z.B. PCR-Virus-DNA-Nachweis) auf eine lokale Virusinfektion der Synovialis hin. Ein eindeutiger Beleg für einen der beiden Modi existiert bis heute nicht.

Vor dieser Ambivalenz sollte die Frage einer relevanten lokalen Virusinfektion des Synovialgewebes im Rahmen der RA geklärt werden. Hierzu wurde am Paraffinschnitt arthritisches Synovialgewebe von Autoimmunarthritiden (überwiegend RA-Proben (n=29), wenige Psoriasis-Arthritis-Proben (PSA, n=6)) sowie als Kontrollkollektiv Fälle von reaktiven, chronischen Arthritiden/Synovitiden (n=26) unter Verwendung nicht amplifizierender *in situ*-Nachweisverfahren (RNA- und DNA-*in situ*-Hybridisierung sowie Immunhistochemie) auf eine Virusinfektion durch Parvovirus B19, CMV und EBV analysiert. Neben dem qualitativen Virusnachweis wurde eine Zelltypcharakterisierung der infizierten Zellen (Synovialis versus Lymphozyten) bzw. eine Bestimmung des viralen Infektionszyklus angestrebt.

Für alle drei Viren wurde eine relevante Synovialinfektion nachgewiesen. Allerdings war keines der Viren auf die RA- (bzw. PSA-) Synovialis-Proben begrenzt und somit spezifisch für die Autoimmunarthritis-Entität. Dennoch betrafen EBV-, CMV- und Parvovirus B19-Infektionen sowohl kumulativ als auch jedes Virus für sich betrachtet die RA- und PSA-Fälle signifikant häufiger als die rA/S-Kontrollgruppe.

Absolut wurde Parvovirus B19 in nahezu 90% der RA-Fälle verglichen mit 38,5% der rA/S-Kontrollfälle immunhistochemisch identifiziert. Diese Virushäufigkeit in der RA-Gruppe überrascht, liegt sie doch deutlich über der allgemeinen Parvovirus B19-Seroprävalenz von 50%-70%. Eine quantitative Betrachtung hinsichtlich Anzahl positiver Zellen und ihrer Verteilung führte zu einer noch schärferen Trennung zwischen der RA- und rA/S-Gruppe. Parvovirus B19-positive RA-Fälle zeigten eine mittlere bis hohe Anzahl virustragender Zellen während die rA/S-Fälle durch überwiegend singuläre Zellinfektion gekennzeichnet waren.

CMV wurde mittels DNA-*in situ*-Hybridisierung in der RA-Gruppe dreimal häufiger als in der rA/S-Gruppe identifiziert; absolut betrachtet waren 31% der RA-Proben CMV-positiv.

EBV-tragende Zellen wurden mittels RNA-*in situ*-Hybridisierung in 48% der RA-Fällen und nur in 23% der rA/S-Fällen nachgewiesen. Unter Berücksichtigung quantitativer (Ausschluss von viruspositiven Einzelzellen) und qualitativer Kriterien (Infektion von synovial lining-Zellen sowie synovialem Stromagewebe) zeigten 7 RA-Fälle und lediglich 1 rA/S-Fall eine definitionsgemäße relevante EBV-Infektion.

Anhand histo-zytomorphologischer Kriterien bzw. mittels immunhistochemischer Zelltypisierung wurde eine Analyse hinsichtlich eines Zelltropismus, d.h. eine Unterscheidung zwischen ortsständigen Synoviozyten versus infiltrierenden Lymphozyten als virale Zielzellen, durchgeführt. Hier konnte für die Herpesviren EBV und CMV neben einer Infektion lymphozytärer Zellen auch eine Infektion der synovial lining-Zellen belegt werden. Parvovirus B19 wurde dagegen ausschließlich in lymphatischen B- und T-Zellinfiltraten nachgewiesen.

Parvovirus B19 ist nicht zur latenten Infektion fähig, d.h. eine Viruspersistenz ist stets an Virusreplikation gebunden. EBV und CMV können beide sowohl ein latentes als auch ein replikatives Infektionsstadium zeigen. Über phasenspezifische Virusproteine

zur Beurteilung der Virusaktivität wurde für EBV und CMV in allen virus-positiven Synovialproben eine latente Infektion nachgewiesen. Im Sinne einer lokalen Aktivierung zeigten zwei Drittel der CMV-positiven Proben eine schwache replikative Komponente; nur wenige Einzelzellen vereinzelter EBV-positiver Synovien befanden sich im lytischen Stadium des EBV-Infektionszyklus.

Zur Analyse einer koinzidenten Multivirusinfektion wurden die am selben Kollektiv erhobenen Daten einer relevanten Parvovirus B19-, CMV- und EBV-Infektion (n=31; definiert qualitativ durch den Befall von Synoviozyten bzw. quantitativ durch ausgeprägte, virustragende Lymphozyteninfiltration) kombiniert und unter dem Aspekt einer Simultaninfektion ausgewertet. Eine solche Multivirusinfektion konnte hierbei in ca. einem Drittel der Synovialproben (13/31) mit definitionsgemäßer relevanter Virusinfektion identifiziert werden; eine relevante Doppel- oder Tripelvirus-Infektion wurde fast ausschließlich unter den RA- und PSA-Fällen (12/13) nachgewiesen. Lediglich ein rA/S-Fall zeigte eine Doppelinfektion. Ausschließlich RA-Proben (n=3), d.h. 10% aller RA-Proben, demonstrierten eine Tripel-Infektion, d.h. eine koinzidente Infektion durch alle drei untersuchten Viren.

Eine spezifische Limitation der Virusinfektion auf die RA-Synovialis ließ sich nicht nachweisen. Dennoch betonen die Ergebnisse, dass eine Virusinfektion nicht nur systemisch, sondern auch im Sinne einer lokalen Synovialinfektion in die RA-Pathogenese involviert ist. Aussagen über eine primäre Ursächlichkeit in der Krankheitsentwicklung können jedoch noch nicht getroffen werden. Die statistisch signifikante Präsenz der Parvovirus B19-Infektion innerhalb der RA-Entität könnte jedoch auf eine Rolle als primäres Agens hinweisen. Basierend auf der dokumentierten Multiviruspersistenz im Synovialgewebe ist auch eine Art Schwellenmodell denkbar, in dem jede Infektion additiv zur Krankheitsgenese oder -progredienz beiträgt. Die dargestellten Untersuchungen zur lokalen Synovialinfektion erbrachten richtungsweisende Erkenntnisse im Hinblick auf eine exogene Komponente in der multifaktoriellen Genese und Modulation der RA und wurden als solche bereits publiziert.



**Study of the Involvement of Viral Synovial Infection in the  
Genesis of Rheumatoid Arthritis**

An *in situ*-analysis of viral nucleic and viral proteins  
in arthritis synovium



## 2 Abstract

The current state of medical knowledge holds that rheumatoid arthritis (RA) is a multifactorial disease. A predisposing family risk factor, the collected data of twin studies and a risk correlation with particular HLA-alleles prove the existence of an endogene, i.e., a genetic component, in the aetiopathogenesis of the RA, but do not explain the RA-genesis exhaustively. Besides the genetic predisposition, hormonal influencing factors as well as bacterial and viral infections, as exogene, i.e. non-genetic determined factors, enter the aetiologic-pathogenetic disease concepts. The first association between a viral infection and the RA-aetiogenesis was based on elevated titers of antibody to EBV and CMV in sera of patients with RA. Using polymerase chain reaction (PCR)-tests, EBV-, CMV- and Parvovirus B19-DNA were detected recently in the synovial fluid and the synovial tissue. With regard to a possible viral contribution to RA-susceptibility, two pathomechanisms that are not mutually exclusive are discussed. In the first case, the findings suggest a systemic contribution that triggers an autoimmune response or immunological cross-reaction. In the second case, the direct viral detection (via PCR-tests) in the joint compartment indicates a local viral infection of the synovialis. A clear evidence for one of the two modi does not yet exist.

Regarding this ambivalence, the existence of a significant viral infection in the synovial tissue of rheumatoid arthritis should be evaluated. For this, synovial specimens of autoimmune arthritis (including predominantly RA-cases (n=29) and only a few psoriatic arthritis-cases (PSA, n=6)) and of reactive chronic arthritis/synovitis (rA/S, n=26) were analyzed for Parvovirus B19-, CMV- and EBV-infection by using a non amplifying *in situ* detection method (RNA- and DNA-*in situ* hybridisation and immunohistochemistry). Furthermore, the investigation aims at developing a characterisation of the infected cells as well as at making a determination of the viral infection cycle.

In summary, a relevant synovial infection was demonstrated for all of these three viruses. But none of these three viruses were limited to the RA- (or PSA-) synovial specimens and thus specific to the autoimmune arthritis. However, infections by

Parvovirus B19, CMV and EBV were, cumulatively and individually, significantly more frequent among the RA- and PSA-cases than in the rA/S-control group.

More specifically, the proportion of cases with Parvovirus B19-positive cells, identified via immunohistochemical analysis, was significantly higher in immune-related arthritis, especially RA (90%) and, to a lesser extent, PSA (66%), compared to rA/S (38.5%). In comparison to a Parvovirus B19-seroprevalence of 50-70% in the population, the especially high frequency of that virus observed among RA-cases was surprising. A quantitative analysis regarding the number of Parvovirus B19-positive cells and their distribution leads to an even more stark distinction between the RA- and rA/S-group. Parvovirus B19-positive RA-cases show a middling- to high number of affected cells whereas the rA/S-cases were characterised by predominantly singular cell-infections.

DNA-*in situ* hybridization revealed CMV-DNA three times more often in the RA-group than in the rA/S-group; in detail, 31% of the RA-specimens were CMV-positive.

EBER 1/2-*in situ* hybridization revealed EBV-positive cells in 48% of the synovial RA-specimens and in only 23% of the synovial rA/S-specimens. With regards to quantitative criteria (excluding cases with loosely scattered single virus-positive cells) and to qualitative criteria (involving cases with affected synovial lining cells as well as affected synovial stroma- and connective tissue-cells) there were 7 RA-specimens and solely 1 rA/S-specimen with definitionally relevant EBV-infections.

By means of histo-cytomorphological criteria and of immunohistochemical cell-characterisation, an analysis of cell-tropism, i.e., a differentiation between orthotopic synoviocytes and infiltrating lymphocytes, was performed. In addition to affected lymphocytic cells, an infection of synovial lining cells was also demonstrated for the herpes viruses CMV and EBV, whereas Parvovirus B19 was shown to be restricted to lymphatic B- and T-cell-infiltrations.

The Parvovirus B19 is not able to infect latently, meaning the persistence of Parvovirus B19 is bound to a permanent, low grade replication. Both EBV and CMV are able to persist in a latent or productive phase of the infection cycle. In order to determine the status of the viral activity an analysis targeting phase-specific viral proteins was performed. All EBV- and CMV-positive synovial specimens were shown to be latently infected. Two third of the CMV-positive cases showed a weak productive component in

terms of a local viral activation; but only few EBV-positive cases exhibited singular cells within a lytic phase of the EBV-infection cycle.

To evaluate the prevalence of a relevant coincidental multivirus-infection the data of relevant Parvovirus B19-, CMV- and EBV-infection (n=31), generated from the same collective, were combined and analysed with the focus on a simultaneous infection. Evidence for a relevant infection of the respective virus was defined by: the presence of CMV-DNA in synovial lining cells for CMV; the presence of EBER1/2 in synovial lining cells or in a high number of infiltrating cells for EBV; and the expression of the capsid protein for Parvovirus B19 in more than single cells. Such a multivirus-infection was identified in a third of all specimens with a definitionally relevant infection (13/31); a relevant double or triple virus-infection was almost exclusively limited to RA- and PSA-cases (12/13); and only one rA/S-case showed an infection by two different viruses. A triple virus-infection, i.e., a coincidental infection of all three analysed viruses, was observed solely in 3 RA-specimens, corresponding to 10% of all RA-cases.

A specific limitation of the viral infection on the RA-synovialis could not be determined. However, our results indicate that a local synovial infection in addition to a systemic viral infection is involved in the RA-pathogenesis. But a statement on a primary causality can not yet be made. The statistically significant presence of Parvovirus B19 within the RA-entity suggests the role of a primary agent. Furthermore, based on the documented multivirus-persistence, a form of threshold model is possible, in which each viral infection contributes additionally to the pathogenesis or disease progress. These presented analyses of a local synovial infection, caused by corresponding viruses, supply trend-setting findings for this exogene component in the field of a multifactorial RA-genesis and RA-modulation and have already been published



## **3 Einleitung**

### **3.1 Rheumatoide Arthritis**

#### **3.1.1 Definition**

Die Rheumatoide Arthritis (RA), synonym wird auch der Name primär chronische Polyarthritis (PCP) verwendet, ist die klinisch und auch sozialmedizinisch bedeutendste Erkrankung aus dem rheumatischen Formenkreis. Die Definition dieser entzündlichen Erkrankung umfasst im Wesentlichen folgende drei basalen Charakteristika: erstens den chronischen Verlauf, zweitens den polyarthritischen Befall und drittens die Systemerkrankung. Primärer Manifestationsort der Entzündung ist die Synovialmembran der Gelenke und Sehnenscheiden. Der schubweise-progrediente Verlauf der Synovialitis führt zur Arthritis und bedingt eine zunehmende Gelenkdeformation bzw. Gelenkdestruktion mit fortschreitender Bewegungseinschränkung, die häufig in vorzeitiger Invalidität endet. Extraartikuläre Manifestationen sind möglich und können die Lebenserwartung der Patienten verkürzen.

#### **3.1.2 Epidemiologie**

Bei einer Prävalenz von 1% in der mitteleuropäischen Bevölkerung wird die epidemiologische Bedeutung dieser Erkrankung evident. Die Erkrankung kann in jedem Lebensalter auftreten, dennoch besteht ein Häufigkeitsgipfel im zweiten bis vierten Lebensjahrzehnt. Betrachtet man die RA in Hinblick auf Geschlechtspräferenz, so zeigt sich ein Gynäkotropismus; Frauen sind drei- bis viermal häufiger betroffen als Männer.

#### **3.1.3 Pathogenese und Histopathologie**

Pathogenetisch wird der Rheumatoiden Arthritis ursächlich eine immunologische Fehlsteuerung unterstellt. Obwohl unser Verständnis des Mechanismus noch unvollständig ist, wird sie zu den Autoimmunerkrankungen gezählt. Bei genetisch disponierten Individuen induzieren die endogenen bzw. exogenen Faktoren eine nicht selbst terminierende Immunreaktion, die zur chronischen Synovialitis führt.

Histopathologisch zeigt sich die Synovialitis in einer inflammatorischen Infiltration der Gelenkschleimhaut mit autoreaktiven T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Plasmazellen und sogenannten dendritischen Zellen, die aus der Monozyten/Makrophagen-Reihe stammen (Bromley et al., 1984). Frühere Modelle betonten stark die Bedeutung von Autoantikörpern, insbesondere des Rheumafaktors, einem Autoantikörper gegen das Fc-Fragment des IgG, und von Immunkomplexen in der Initiation der RA (Firestein et al., 2003). Nach derzeitigem Verständnis gewinnen die aus der Interaktion von T-Lymphozyten und Monozyten frei werdenden proinflammatorischen Zytokine (v.a. TNF- $\alpha$ , Interleukin 1, Interleukin 6) an Bedeutung (Firestein et al., 2005). Insbesondere ein Ungleichgewicht der Zytokine (TNF-  $\alpha$ , IL1, IL6, IL12, IL15, IL18, IL22) soll der Perpetuation der chronischen Entzündung zugrunde liegen (Dayer et al., 2003; McInnes et al., 2004; Ikeuchi et al., 2005). Die Immunreaktionen münden mit der Aktivierung des Komplementsystems sowie der Freisetzung von Entzündungsmediatoren und knorpelaggressiven Enzymen in eine destruktive Synovialitis. Über eine Proliferation der Fibroblasten-ähnlichen Typ B-Synoviozyten und einer Invasion von phagozytierenden Typ A-Synoviozyten wandelt sich die einschichtige Synovialendothelschicht in ein mehrschichtiges, zottig proliferierendes Gewebe um (Burmester et al., 1983); es bildet sich der sogenannte Pannus. Die transformierten Synovialzellen wachsen tumorähnlich infiltrativ in benachbartes Gewebe und destruieren auf unklarem Wege den angrenzenden Knorpel, die Sehnen und Knochen. Dieser Prozess kann bis zur vollständigen Gelenkzerstörung führen (Bromley et al., 1984). Eine Freisetzung von Enzymen (u.a. Kollagenasen, Proteinasen) aus dem Pannusgewebe und den untergegangenen Zellen stellt eine weitere wesentliche Komponente im Destruktionsprozess dar.

#### **3.1.4 Klinik**

Unspezifische Allgemeinsymptome wie Abgeschlagenheit, rasche Ermüdbarkeit, nächtliches Schwitzen, subfebrile Temperaturen und Myalgien können als Prodromi den fassbaren Erstsymptomen vorausgehen. Die Erkrankung beginnt oft schleichend mit einer unbemerkten Schwellung und typischen Morgensteifigkeit im Frühstadium. Spätere Stadien sind im Rahmen der chronischen Synovialitis und Knorpeldestruktion assoziiert mit Schmerzen und Überwärmung der betroffenen Gelenke. Als klassische

Erstmanifestation imponiert oft ein symmetrischer Befall der Fingergrund- und Mittelgelenke, oft auch der Zehengrundgelenke. Die Entzündung kann auch auf benachbarte Gelenkstrukturen im Sinne von Tendovaginitiden und Bursitiden übergreifen. Prinzipiell gibt es kein Gelenk, dessen Befall ausgeschlossen ist. Dabei ist insbesondere auf eine Beteiligung der HWS im kranio-cervikalen Übergang mit konsekutiv gefährlicher Instabilität zu achten. Neben dem klassisch schleichenden, polyarthritischen Befall sind - wenn auch seltener - v.a. bei jüngeren Menschen, atypisch beginnende Krankheitsverläufe mit akutem mono- oder oligoarthritischem Befall großer Gelenke zu beobachten. Die Synovialitis bzw. Arthritis führt kontinuierlich über Knorpel- und Knochendestruktion sowie gelenknaher Osteoporose zur Arthrose bis Ankylose des Gelenkes. Pathognomonisch für die RA sind Funktionsverluste und Fehlstellung der Hand- und Fingergelenke, u.a. als Ulnardeviation, Schwänen- und Knopflochdeformität der Finger beschrieben, die nach einer Erkrankungsdauer von 3 Jahren zu 90% nachweisbar sind.

Der klassische Krankheitsverlauf zeigt eine chronisch linear-progrediente oder schubweise-progrediente Dynamik. Die Erkrankung kann prinzipiell auf jeder Stufe sistieren, allerdings meist mit Persistenz der Schäden. Von der sehr seltenen Remission mit fehlender Bewegungseinschränkung bis hin zur Invalidität in 10-15% der Krankheitsfälle sind alle Ausprägungsgrade möglich.

Auch eine extraartikuläre Symptomatik ist möglich. Neben der Ausbildung von Rheumaknoten sind v.a. systemische Organmanifestationen zu berücksichtigen, die die Prognose der Erkrankung entscheidend beeinflussen. Die häufigsten Organmanifestationen stellen asymptomatische Beteiligungen der serösen Haut von Lunge und Herzen dar. Einer Pleuritis oder Perikarditis könnte aufgrund der embryonalen Verwandtschaft zur Synovialmembran ein identischer, zur Inflammation führender Pathomechanismus zugrunde liegen. Interstitielle Lungenerkrankungen oder strukturelle Myokard- oder Klappenerkrankungen sind selten. Beteiligungen anderer Organe wie Leber oder Niere sind meist auf Vaskulitiden zurückzuführen. Aufgrund der Möglichkeit einer Keratokonjunctivitis sicca oder einer (Epi-)Skleritis sind RA-Patienten ggf. auch augenärztlich zu betreuen.

### 3.1.5 Diagnosekriterien

Zur Diagnosestellung der Rheumatoiden Arthritis hat das *American College of Rheumatologie* (ACR) Kriterien aufgestellt (vgl. Tabelle 1). Diese Kriterien sollen insbesondere das Erkennen der schwer zu diagnostizierenden Frühstadien erleichtern. Die Diagnose des Vollbildes einer Rheumatoiden Arthritis bereitet kaum Schwierigkeiten, aber eine kurative Therapie ist dann nur noch selten möglich.

Tabelle 1 revidierte, diagnostische Kriterien für die Klassifikation der chronischen Polyarthritits des American College of Rheumatologie (ACR, 1987) (Arnett et al., 1988)

	Kriterium	Definition
1	Morgensteifigkeit	Morgensteifigkeit in und um die Gelenke von mindestens 1 Stunde Dauer bis zum vollständigen Abklingen
2	Arthritis von drei und mehr Gelenkregionen	Mindestens drei Gelenkbereiche müssen gleichzeitig eine Weichteilschwellung oder einen Erguss gehabt haben. Die 14 möglichen Gelenkregionen sind rechts oder links PIP, MCP, Hand-, Ellenbogen-, Knie-, Sprung- und MTP-Gelenke.
3	Arthritis der Hand- oder Fingergelenke	Mindestens eine Gelenkregion geschwollen in einem Hand-, MCP- und/oder PIP-Gelenk
4	Symmetrische Arthritis	Gleichzeitiger Befall der gleichen Gelenkregionen (wie unter 2) auf beiden Körperseiten. Bilateraler Befall von PIP-, MCP- oder MTP gilt auch ohne absolute Symmetrie
5	Rheumaknoten	Subkutane Knoten über Knochenvorsprüngen, Streckseite oder in Gelenknähe
6	Rheumafaktoren	Befund abnormaler Titer des Serum-Rheumafaktors mit einer Methode, die in weniger als 5% der normalen Kontrollpersonen positiv ist.
7	Typische radiologische Veränderung	Für die chronische Polyarthritits typische radiologische Veränderung auf einer p.a.-Aufnahme der Hand (Finger- und Handgelenke): Erosionen oder eindeutige Knochenentkalkung, lokalisiert an den betroffenen Gelenken oder unmittelbar an diese angrenzend (arthrotische Veränderungen allein gelten nicht)

Der Patient hat eine chronische Polyarthritits, wenn er/sie mindestens 4 der obigen sieben Kriterien erfüllt. Die Kriterien 1-4 müssen für mindestens 6 Wochen bestanden haben.

PIP, proximale Interphalangealgelenke;  
MCP, Metakarpophalangealgelenke;

MTP, Metatarsophalangealgelenke;  
p.a, posterior-anterior;

### 3.1.6 Diagnostik

Die Diagnosefindung basiert wesentlich auf der Anamnese und den klinische Befunden. Standen bisher klassische Röntgenbilder ergänzend im Vordergrund der Bildgebung, so halten aktuell MRT und Sonographie zunehmend Einzug und ermöglichen eine frühe Diagnosestellung mit früherer Therapieoption sowie besserer Langzeitprognose.

Aufgrund des autoimmun-inflammatorischen Charakters spielen neben klassischen Entzündungsparametern (BSG, Interleukin 6-abhängiges CRP) auch immunologische Parameter (Rheumafaktor, Anti-CCP-Antikörper, etc) eine diagnostische und prognostische Rolle.

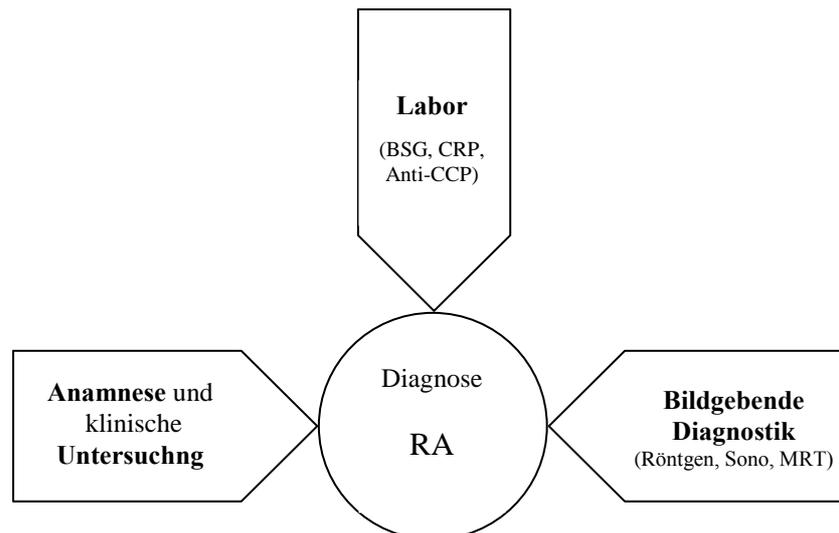


Abbildung 1 Diagnostiksynopse der Rheumatoiden Arthritis (RA) (J.Strunk DMV 30, Juli 2005)

### 3.1.7 Therapie

Aus der charakteristischen Symptomtrias (Schmerz, Destruktion und Funktionseinschränkung) bei rheumatoider Inflammation des Gelenkes lassen sich die grundlegenden Therapieprinzipien entwickeln (Strunk et al., 2005; Capriotti et al., 2004; Aeschlimann et al., 1998).

- 1) Einsatz von DMARADs (disease modifying anti-rheumatic drugs). Diese Medikamente, früher unter dem Terminus Basistherapeutika gruppiert, haben die Potenz den Krankheitsprozess und damit die **Gelenkdestruktion** aufzuhalten oder zu verlangsamen.
- 2) **Schmerzreduktion** durch den pharmakologischen Einsatz von NSAR (nicht-steroidale Antirheumatika oder Antiphlogistika), wobei gelegentlich auch zusätzlich potente Analgetika indiziert sind.
- 3) Erhalt der **Funktionalität** und Wiederherstellung der Leistungsfähigkeit durch eine stadienadaptierte Physiotherapie, Krankengymnastik sowie Ergotherapie.

Der Aktivitätsgrad und das Stadium der Erkrankung bestimmen das Therapieregime. Ein kausales, zur Remission führendes Therapieschema bei gesicherter RA existiert nicht. Die einzelnen Therapieoptionen, vielfach als komplementäre Methoden zu verstehen, müssen dennoch nach Wirksamkeit und Verträglichkeit individuell ausgewählt werden (Strunk et al., 2005).

Im Frühstadium einer RA erfolgt aus dem Grundverständnis einer inflammatorischen Genese der Einsatz von NSAR. Ihre rasche analgetische und antiphlogistische Wirkung, vermittelt über eine Hemmung der Cyclooxygenase mit Reduktion der Prostaglandinsynthese, zielt auf eine symptomatische Schmerzlinderung ab. Initial kann der Einsatz von Kortikoiden zur schnellen Entzündungshemmung indiziert sein, insbesondere bei Versagen der klassisch-symptomatischen NSAR-Therapie. Bei Monoarthritiden stellt die intraartikuläre Steroidinjektion eine nebenwirkungsarme, effektive Therapiealternative dar.

Nach dem Empfehlungsschema der DGRh (Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie) sollte bei Persistenz der Beschwerden über 6 Wochen unter symptomatischer Medikation eine Therapie mit Basistherapeutika eingeleitet werden. Zum Teil ohne Kenntnis des exakten Wirkmechanismus beeinflussen diese Pharmaka den pathogenetischen Mechanismus der RA. Aus dem breiten Repertoire an DMARADs haben sich das Immunsuppressivum Methotrexat und alternativ der Immunmodulator Leflunomid aufgrund ihrer günstigsten Nutzen-Risikoverhältnisse als initiale Basistherapie der Wahl etabliert (Strunk et al., 2005).

Je nach Ansprechen auf die initiale Basistherapie muss die Medikation nach einem Stufenschema mit weiteren DMARADs erweitert werden. Bleibt ein Therapieerfolg unter einer adäquaten Kombinationstherapie (mindestens zwei Basistherapeutika, eines davon MTX) nach 6 Monaten aus, ist nach den Leitlinien der DGRh bei gesicherter, aktiver RA die Applikation von Zytokinantagonisten, sog. „biologics“, indiziert. Der Einsatz dieser biologischen Inhibitoren des Zytokinsystems greift in die der chronischen Entzündung der RA zugrunde liegende und sie unterhaltende Dysbalance im zytokinregulierten Immunsystem ein (Taylor et al., 2003; Singh et al., 2005; Goldblatt et al., 2005). Antikörper gegen TNF $\alpha$ -Rezeptoren (Infliximab), ein löslicher TNF $\alpha$ -

Rezeptor (Etanercept) oder ein Interleukin-1-Rezeptorantagonist (Anakinra) wirken inhibitorisch auf die Immunreaktionen und somit dem Ungleichgewicht entgegen.

Bei monoarthritischem oder oligoarthritischem Befall finden interventionelle Synovialektomien oder Synoviorthesen mit dem präventiven Ziel der Frühelimination der immunkompetenten Synovialmembran Zugang in die Therapie.

Bei manifesten Deformitäten stehen zahlreiche operative Verfahren (von Korrekturosteotomie bis zum kompletten endoprothetischen Ersatz) zur Rekonstruktion und Funktionserhalt des Gelenkes zur Verfügung.

Zusammengefasst lässt sich konstatieren, dass das frühere Konzept einer rein symptomatischen Therapie zugunsten eines patientenadaptierten, multimodalen Ansatzes (bestehend aus Basistherapeutika, Biologics, Interventionen und operativer Therapie, physikalischer Therapie sowie krankengymnastischen Maßnahmen) mit dem Ziel einer möglichst schnellen und kompletten Remission verlassen wurde.

### **3.1.8 Ätiologie**

#### **3.1.8.1 Genetische (endogene) Faktoren**

Obwohl viele ätiopathologische Faktoren bekannt sind, konnte die eigentliche Ursache der Rheumatoiden Arthritis letztlich noch nicht geklärt werden. Sicher kann man von einer multifaktoriellen Genese ausgehen. Eine familiäre Häufung der Rheumatoiden Arthritis lässt eine erbliche Disposition vermuten, obwohl die Erkrankung nicht den Mendel'schen Vererbungsmechanismen folgt. Die Risiko-Ratio für direkte Nachkommen von RA-Patienten schwankt in der Literatur zwischen 4% und 8% (Grant SF et al., 2001). Hohe Konkordanzraten einer RA-Entwicklung unter monozygoten Zwillingen weisen auf eine starke genetische Beteiligung an der RA-Genese hin (Jarvinen et al., 1994). Dieser obere Schwellenwert (Konkordanzrate) einer genetischen Beteiligung wurde lange Zeit auf 32% (Saweda et al., 2005) geschätzt, eine neue Zwillingsstudie korrigierte den Wert um ca. die Hälfte auf 15% nach unten (Silman et al., 1993). Eine aktuelle Auswertung der Zwillingsstudien, die nicht nur auf die reine Erkrankungskonkordanz der RA abzielt, sondern über eine Analyse einzelner Krankheitscharakteristika den erblichen Anteil berechnet, quantifiziert die genetische Beteiligung dagegen wieder auf 50%-60% (MacGregor et al., 2000).

Dass darüber hinaus andere, nicht genetische Faktoren bedeutsam sind, zeigt u.a. eine nachgewiesene Heterogenität im Phänotyp der RA bei vergleichenden Untersuchungen an RA-konkordanten, monozygoten Gemini. Stimmen die Zwillingspaare bzgl. Eintrittsalter und präsentem Rheumafaktor überein, unterscheiden sie sich doch hinsichtlich des Gelenkbefallsmusters, des Auftretens extraartikulärer Organbeteiligung, klinischem Krankheitsverlauf und Invalidität (MacGregor et al., 1995).

Durch Entdeckung der Assoziation der Rheumatoiden Arthritis mit bestimmten HLA-DR-Molekülen (Nepom et al., 1989) findet die genetische Beteiligung ein nachweisbares Korrelat auf molekularbiologischer Ebene (HLA, **H**umanes **L**eukozyten **A**ntigen-System). Die HLA-Klasse II-Moleküle dienen der Antigen-Präsentation an T-Zellen und interagieren mit den spezifischen T-Zell-Rezeptoren. Die HLA-DRB1-Allele codieren die  $\beta$ -Kette der HLA-Klasse II-Moleküle. Insbesondere das HLA-DR4-Antigen prädisponiert zur Entwicklung einer Rheumatoiden Arthritis (Wordsworth et al., 1989). In der Normalbevölkerung hat das HLA-DR4 eine Genfrequenz von 20%, wohingegen RA Patienten in 60% - 70% Träger dieses Risikoallels sind (Lemmel EM et al., 1988).

Die Subtypisierung der HLA-DRB1-Allele hinsichtlich der RA führt zu einer Klassifikation in drei Gruppen (Reviron et al., 2001). Man unterscheidet eine HLA-DR4-Allel-Risikogruppe (hierunter fallen alle Subtypen außer \*0402 und \*0403) und HLA-DR1-Allel-Risikogruppe, die jeweils in einer statistisch prädisponierenden Assoziation zur RA stehen. HLA-DR3- und HLA-DR15-Merkmalträger haben kein erhöhtes Risiko eine RA zu entwickeln; sie bilden die RA-neutrale Gruppe. Einige Allele wie das HLA-DR7, HLA-DR8 und HLA-DRB1\*0402 wirken sogar scheinbar protektiv und gehen mit einem verminderten Erkrankungsrisiko einher (Balandraud et al., 2004).

Alle RA-prädisponierenden HLA-DRB1-Allele, sowohl die vom DR1- als auch vom DR4-Typ (\*0101, \*0102, \*0404, \*0405 und \*0408), zeigen eine weitgehend homologe Aminosäuresequenz, nämlich das QK/RRAA- oder RRRAA-Motiv, in der dritten hypervariablen Region (HVR3) der  $\beta$ -Kette. Diese strukturelle Identität führt zu Entwicklung der Shared epitope (SE)-Hypothese, die die QK/RRAA-Sequenz als Risiko-Epitop beschreibt (Gregersen PK et al., 1987). Der ätiopathologische

Mechanismus dieser Risikohaplotypen ist noch unklar. Das relative Risiko eine RA zu entwickeln ist nicht nur abhängig von der Anzahl der SE-positiven Haplotypen, sondern richtet sich auch nach der individuellen Kombination des Genotypus. Im Vergleich mit SE-negativen Individuen besteht bei einem single SE-Allel-Trägerstatus ein 4fach erhöhtes Risiko, bei zwei SE-Allelen sogar ein 8fach erhöhtes Risiko, eine RA zu entwickeln. Liegt ein so genannter „compound heterozygoter“ Genotyp der HLA-DRB1-Allele \*0401/\*0404 vor, steigt das Risiko auf den Faktor 26 (MacGregor et al. 1995). Interessanterweise scheinen sich die Risikoallele in der Stärke ihrer Assoziation zur RA und damit in ihrem Gewicht als Risikofaktor zu unterscheiden (Thomson W et al., 1992). Dieses variable Risiko lässt sich nicht mit der Shared epitope-Hypothese, d.h., dass alle Risikoallele ein identisches, RA-assoziiertes Epitop codieren, vereinbaren.

Zudem muss es weitere Faktoren geben, die die RA-Ätiopathogenese beeinflussen, denn auch Individuen ohne SE-Haplotyp-Trägerstatus können eine RA entwickeln.

Die HLA-Region auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 ist ein genreiches Areal, welches noch weitere RA-assoziierte Gene bzw. den Immunprozess modulierende Gene beherbergt. Bei bekannter Assoziation von Tumornekrosefaktor (TNF) und RA ist insbesondere die räumliche Co-Lokalisation dieser beiden Gene interessant.

Zusammenfassend ist jedoch, trotz einer nachweislich hohen genetischen Komponente, eine rein genetische Kausalität nicht allein erklärend für die Genese der RA.

#### 3.1.8.2 Exogene Faktoren (Umweltfaktoren)

Neben einem genetischen Faktor gewinnen exogene Faktoren bzw. Umweltfaktoren in der Ursachenkette an Gewicht. Neben der reinen Wortbedeutung im Sinne von Expositionsfaktoren umfasst der Begriff „Umweltfaktor“ auch innere Faktoren mit Assoziation zur RA, die jedoch keine offensichtliche genetische Basis aufweisen.

Als nicht-genetische Einflussfaktoren werden v.a. bakterielle und virale Infektionen diskutiert. Daneben scheinen auch hormonelle Faktoren sowie eine Nikotin-Anamnese eine Rolle zu spielen.

#### 3.1.8.2.1.

Hormonelle Faktoren (Cutolo et al., 2002; Cutolo et al., 2004), insbesondere weibliche Steroidhormone (Gynäkotropismus und Veränderungen im Rahmen der Gravidität), scheinen als nicht-genetische Host-Faktoren mit der RA assoziiert zu sein (Spector et al., 1990). Es besteht eine weibliche Prädominanz mit einer Kumulation der Erstmanifestation im reproduktionsfähigen Alter sowie einer Subgruppe von RA-Patientinnen mit postmenopausalem Krankheitsbeginn (Dugowson et al., 1991). Eine häufige Zunahme der Arthritis-Symptome während der Lutealphase des Menstruationszyklus, d.h. wenn die gonadale Steroidproduktion (hauptsächlich von Progesteron) maximal ist, stärkt die Vermutung einer exogenen Beeinflussung durch weibliche Sexualhormone.

Ein bekanntes Phänomen ist die Aktivitätsmodulation der RA während und nach Gravidität. 70%-80% der Frauen erfahren eine Remission oder Besserung ihrer RA während der Schwangerschaft und ein Wiederaufflammen der RA in der postpartalen Phase (Silman et al., 1992), was ggf. auf die Veränderung des Hormonhaushalts zurückgeführt werden kann.

Allerdings impliziert eine Schwangerschaft nicht nur eine Umstellung des Hormonhaushaltes, sondern geht auch mit immunologischen Veränderungen einher. Im Rahmen der immunologischen Alteration während der Schwangerschaft tritt eine Zunahme von löslichen Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ )-Rezeptoren, ein seroplasmatischer Anstieg von Interleukin 1-Rezeptor-Antagonisten und Cytokin-Sekretion aus prädominanten TH2-Zellen auf (Ostensen et al., 2005; Branch et al., 1992; Wegmann et al., 1993). Diese können den klinischen Verlauf der RA beeinflussen.

Als weiterer exogener Dispositionsfaktor für die Entwicklung einer RA wurde das Rauchen identifiziert. Der Mechanismus, der diesem Risikozuwachs zugrunde liegt, ist noch ungeklärt (Aho et al., 2004).

#### 3.1.8.2.2.

Seit Beginn der RA-Forschung werden infektiöse Agenzien, d.h. Bakterien und Viren, als exogene, ätiologische Auslöser oder pathogenetische Co-Faktoren der Rheumatoiden Arthritis vermutet.

Bakterien und vor allem Viren stehen generell an der Spitze der häufigsten unspezifischen Arthritis-Ursachen beim Menschen (Philips et al., 1997; Krause et al., 1996). Staphylokokken und Streptokokken sind die klassischen Erreger der akut bakteriell-purulenten Arthritis. Der Gelenkbefall erfolgt durch eine hämatogene Streuung oder durch eine traumatische oder z.T. auch iatrogene Gelenkperforation.

Die Gelenkmanifestation im Rahmen des Rheumatischen Fiebers ist hingegen keine synoviale Keiminfektion, sondern eine sterile Post-Streptokokken-Erkrankung mit einem pathogenetischen Immunmechanismus.

Bei Infektion mit einer Reihe unterschiedlicher Viren ist die Entwicklung einer Arthritis-Symptomatik bekannt. Die mögliche Pathogenese der Symptome umfasst dabei zwei unterschiedliche Mechanismen. Gemäß dem zeitlichen Auftreten einer virusassoziierten Arthritis im Folgestadium nach einer systemischen Virusinfektion werden zum einen pathogenetisch autoimmunologisch kreuzreagierende Antikörper im Rahmen der Immunantwort gegen virale Epitope oder Ablagerung von Immunkomplexen im Synovialkompartiment mit konsekutiver, inflammatorischer Reaktion - analog zur oben beschriebenen Poststreptokokken-Erkrankung - vermutet (Balandraud et al., 2004). Zum anderen wird eine lokal persistierende, latente oder lytische Virusinfektion der Gelenkschleimhaut diskutiert (Friedman et al., 1980; Krause et al., 1996; Takeda et al., 2000).

Eine virale Beteiligung, insbesondere des Epstein-Barr Virus und des Parvovirus B19, an der Pathogenese der RA wird seit einem Vierteljahrhundert diskutiert (Balandraud et al., 2004; Kerr et al., 2000). Die ersten Assoziationen des EBV mit RA basieren auf serologischen Daten mit erhöhten EBV-Antikörpertitern und einem erhöhten RA-Erkrankungsrisiko im Vergleich zur Normalbevölkerung (Kosaka et al., 1979; Alspaugh et al., 1981; Ferrell et al., 1981; Sculley et al., 1984; Ferraro et al., 1993). Ferner ist eine CMV-Seropositivität mit einem erhöhten RA-Erkrankungsrisiko assoziiert. Verglichen mit der Virusinfektion entweder durch CMV oder EBV geht die kombinierte Seropositivität für beide Viren mit einem mehr als rein additiv erhöhten RA-Erkrankungsrisiko einher. Auf dem Boden der serologischen Daten wurden zahlreiche, überwiegend PCR-basierte Studien durchgeführt, um mit Nachweis viraler Genome im Synovialkompartiment die Hypothese einer viralen Beteiligung an der RA zu

untermauern. Es wurde die Präsenz verschiedener Viren, insbesondere von Herpesviren (EBV, CMV, HSV 1+2, VZV) sowie von Parvovirus B19, sowohl in der Synovia als auch im Synovialgewebe von RA-Patienten dokumentiert (Takei et al., 1997; Saal et al., 1992; Saal et al., 1999; Stahl et al., 2000; Einsele et al., 1992). War eine Parvovirus B19-Infektion bisher klassisch mit einer akuten, selbstlimitierenden Arthritis vergesellschaftet, deuten neue Studienergebnisse auf eine lokale Persistenz im Gelenkkompartiment hin (Saal et al., 1992; Kerr et al., 2000; Soderlund et al., 1997).

In Folgestudien konnten insbesondere für EBV, CMV und Parvovirus vielfältige Hinweise gesammelt und pathogenetische Modelle auf Molekular- und Zellebene entwickelt werden, die eine initiale oder eine supportive Rolle in der Genese der Rheumatoiden Arthritis unterstreichen. Die detaillierte Beleuchtung dieser Viren (EBV, CMV und Parvovirus B19) im Kontext der RA erfolgt im nächsten Kapitel.

## **3.2 Humanpathogene Viren mit Beteiligung in der Ätiologie bzw. Pathogenese der RA**

### **3.2.1 Parvovirus B19**

Das Parvovirus B19 wurde von Cossart und Mitarbeitern 1975 inzidentuell bei einer immunoelektrophoretischen Analyse von Blutproben auf ein Hepatitis B-Antigen entdeckt (Cossart et al., 1975). Eine bisher unbekannte Präzipitatlinie aus der Serumprobe Nr. 19 in der Reihe B wurde elektronenmikroskopisch aufgearbeitet und zeigte 23 nm große Partikel mit Homologie zu den Parvoviren und wurde namensgebend (Cassinotto et al., 2002). Die Klassifikation als humanpathogenes Virus erfolgte mit der Identifikation des Parvovirus als Erreger der Ringelröteln bzw. des Erythema infectiosum (Anderson et al., 1983).

Das Genom des Parvovirus B19 besteht aus einem linearen DNA-Einzelstrang und codiert neben einem hauptsächlichen Nichtstrukturprotein NS1 für zwei Kapsidproteine, das VP1 und VP2. Beide Strukturproteine sind Splicevarianten eines Haupttranskriptes, wobei die Aminosäuresequenz des kleineren Kapsidproteins VP2 vollkommen in VP1 enthalten ist. Die Seroprävalenz liegt altersabhängig zwischen 50% und 70%.

Parvovirus B19 wird via Tröpfcheninfektion übertragen und ist lediglich zur lytischen Infektion bzw. einer Persistenz unter permanenter Replikation fähig. Die Ausbildung eines Latenzstadiums oder die Integration in das Wirtsgenom lassen sich nicht beobachten. Die Zielzellen des Parvovirus B19 sind die humanen Vorläuferzellen der erythropoiden Reihe im Knochenmark. Dieser strenge Tropismus wird über das P-Antigen bzw. Globosid, ein zellmembranständiges Glykosphingolipid der roten Progenitorzellen, spezifisch vermittelt.

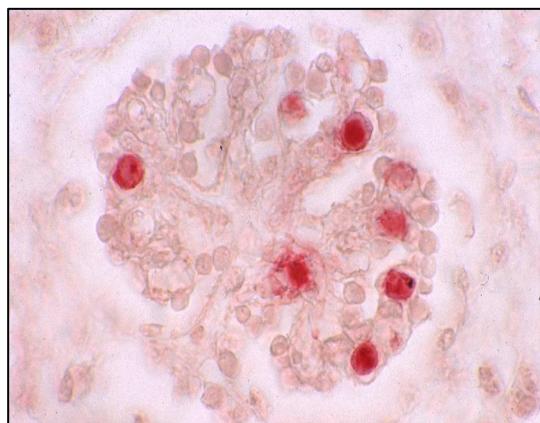
Die Infektion mit Parvovirus B19 verläuft in vielen Fällen (> 20%) asymptomatisch (Woolf et al., 1989). Die häufigste klinische Manifestation ist das Erythema infectiosum. Nach einer Prodromalphase mit grippeähnlichen Allgemeinsymptomen tritt vor allem im Kindesalter das charakteristische, leuchtend rote Exanthem auf den Wangen in Erscheinung, welches eine Ausbreitungstendenz auf Stamm und Extremitäten zeigt.

Häufigste Komplikation der Parvovirus B19-Infektion sind Arthralgien bzw. akute, selbstlimitierende Arthritiden, und zwar bevorzugt der Arm-, Hand- und Fingergelenke. Auch wenn diese im Kindesalter nur in weniger als 10% der symptomatischen Fälle auftreten, klagen Erwachsene, vor allem Frauen, in 80% der Fälle über eine Arthropathie (Ager et al., 1966; Reid et al., 1985; Speyer et al., 1998).

Die Gelenkbeteiligung zeigt oft eine symmetrische, polyartikuläre Verteilung mit unterschiedlicher Dauer. Diese tritt in 20% der Fälle für mindestens 2 Monate auf (Woolfs et al. 1989).

Aufgrund des Tropismus zu roten Vorläuferzellen im Knochenmark und konsekutiver Lyse der Wirtszelle kann die Virusproduktion mit einer milden oder subklinischen Anämie einhergehen. Ist neben dieser virus-induzierten Reifungsstörung der Erythrozyten eine chronische Anämie mit verkürzter Lebensdauer der Erythrozyten präexistent (z.B. Sichelzellanämie, Thallassämie etc.), können komplizierte Anämien bis zu transienten, aplastischen Krisen mit Lebensgefahr auftreten.

Aufgrund der hämatologischen Manifestationen schenkt man einer Parvovirus-Infektion in der Schwangerschaft besondere Aufmerksamkeit. In einem Drittel der Fälle kommt es bei symptomatischer Erstinfektion in der Schwangerschaft zu einem transplazentaren Übergang des Virus auf den Feten. Vor allem im zweiten Trimenon, wenn die fetale Haupt-Hämatopoese stattfindet, kann diese vertikale Infektion dramatische Anämien oder einen Hydrops fetalis, ggf. mit Fruchttod verursachen (Miller et al., 1998; Mehraein et al., 1991; Tolvenstam et al., 2001).



*Abbildung 2  
Beispiel der Parvovirus B19-VP1/VP2-IHC  
Die Abbildung zeigt eine Parvovirus B19-positive  
fetale Niere bei Hydrops fetalis nach Infektion in der  
Schwangerschaft. (eingesetzt als Positivkontrolle)*

### 3.2.2 Das Parvovirus B19 im Kontext der Rheumatoiden Arthritis

Neben der häufigen, akut-verlaufenden, selbstlimitierten Parvovirus B19-Arthritis existieren auch seltenere, chronische Verläufe mit Symptomen über Jahre (White et al., 1985). Phänotypisch erfüllen diese chronischen Parvovirus B19-assoziierten Gelenkentzündungen oftmals die klinischen Diagnosekriterien der Rheumatoiden Arthritis (Naides et al., 1990). Diese chronischen Polyarthritiden nach Parvovirus B19-Infektion können homolog zur RA und im Gegensatz zu den assoziierten, akuten Entzündungen erosive Verläufe zeigen (Gran JT et al., 1995; Tyndall et al., 1994). Mit einsetzender humoraler Immunantwort gegen die Virusproteine wird normalerweise die Remission der Parvovirus B19-Arthropathie eingeleitet, so dass die chronischen Verläufe nicht nur, aber bevorzugt in Individuen mit einer Störung der Immunkompetenz auftreten.

Die Arbeitsgruppe Kerr et al. untersuchte in einer Longitudinalstudie die Inzidenz und Signifikanz einer Autoantikörperproduktion nach Parvovirus B19-Infektion und konnte nicht selten die Entwicklung von Rheumafaktoren aufzeigen (Kerr et al., 1996; 2000).

Basierend auf den klinischen Beobachtungen wurden zunehmend Experimente auf einen bestätigenden, lokalen Parvovirus B19-Nachweis in den betroffenen Gelenken ausgerichtet. Im Jahre 1988 wurde erstmals das Virus aus der Synovialflüssigkeit bei Synovitis infolge einer bewiesenen Parvovirus B19-Infektion isoliert (Dijkmans et al., 1985). Kandolf et al. konnten 1989 erstmals die Präsenz des Parvovirus B19 in Zellen aus der Synovialflüssigkeit bei reaktiver Arthritis nachweisen (Kandolf et al., 1989). In einer Reihe verschiedener PCR-basierter Studien wurde in der Gelenkschleimhaut das Parvovirus-B19-Genom detektiert (Stahl et al., 2000; Saal et al., 1992; Murai et al., 1999; Takahashi et al., 1998). Der Arbeitsgruppe Saal gelang es, das Virus in der Synovialmembran von RA-Patienten nachzuweisen (Saal et al., 1992). Mittels PCR-Technik wurde hierbei in 75% der untersuchten RA-Fälle das Virusgenom deutlich häufiger nachgewiesen als in einem 15%igen Anteil in der Kontrollgruppe. Im Rahmen einer Studie zur Frage einer RA-Entwicklung nach einer akuten Parvovirus B19-Infektion konnte in einer kleinen prospektiven Teilstudie gezeigt werden, dass ein Drittel der Probanden nachfolgend einen positiven RF sowie eine destruiierende Polyarthritiden entwickelten (Murai et al., 1999). Takahashi et al. demonstrierten darüber

hinaus in einem kleinen Kollektiv, dass alle Patienten mit Parvovirus B19-DNA-positiven, aktiven RA-Läsionen VP1-Antikörper exprimierten (Takahashi et al., 1998).

Die genaue Pathogenese der Arthropathie durch das Parvovirus B19 ist noch ungeklärt. Neben einer autoimmunologischen Komponente werden der mögliche Einfluss zirkulierender Immunkomplexe sowie eine mögliche direkte, synoviale, zytotoxische Wirkung des Parvovirus B19-Virus diskutiert. So ist der Beginn der Gelenkbeschwerden koinzident mit dem Ende der Virämie und dem Auftreten der spezifischen Immunglobuline. Des Weiteren zeigten Lunardi et al. (1998), dass bevorzugt in Patienten mit RA VP1/2-spezifische IgG-Antikörper spezifisch mit dem menschlichen Kollagen Typ II reagieren. Als interessanter Aspekt in Hinblick auf die HLA-gekoppelte genetische RA-Disposition zeigte sich, dass die Ausprägung von HLA-DR4, dem RA-Risiko-Allel, mit einer prolongierten Parvovirus B19-Persistenz assoziiert war. Hinweise auf eine Progression der virus-induzierten Arthritis zur Rheumatoiden Arthritis wurden allerdings nicht gefunden (Klouda et al., 1986; Gendi et al., 1996).

### 3.2.3 Cytomegalievirus (CMV)

Im Jahre 1881 entdeckte der deutsche Pathologe Hugo Ribbert mikroskopisch erstmals zytomegale Zellen in der Niere eines totgeborenen,luetischen Kindes. Ähnliche zytopathische Effekte wurden gehäuft im Speicheldrüsengewebe beobachtet. Bei Verdacht auf eine virale Genese prägte man den Begriff „Speicheldrüsenvirus“ (1925) (Doerr und Scholz et al., 2002). Mittels Isolierung des Genoms durch Weller et al. im Jahre 1956 wurde die virale Ätiologie gesichert. In Anlehnung an die histomorphologischen Veränderungen etablierte sich neben der Taxonomie als humanes Herpesvirus 5 der Eigenname Cytomegalievirus.

Entsprechend den Charakteristika der Herpesviridae ist auch das Cytomegalievirus sowohl zur lytisch-replizierenden als auch zur latent-persistierenden Infektion befähigt. Das doppelsträngige, lineare DNA-Genom ist umhüllt von einem eikosahedralen Kapsid, welches seinerseits umgeben ist von einer Tegumentmatrix (McGavran et al., 1965) sowie einer Hüllmembran (envelope). Zur CMV-Diagnostik werden häufig Antikörper bzw. Nukleotidsonden herangezogen, die das immundominante Tegument-Phosphoprotein pp65 oder seine RNA erkennen (Landini et al., 1991).

Die viralen Nukleokapside werden im Kern der Wirtszelle synthetisiert und aggregieren zu einem Kerneinschlusskörper, der lichtmikroskopisch als der pathognomonische „Eulenaugeneffekt“ zu beobachten ist (Severi et al., 1988). Nach Transmission ins Zytoplasma unter Vesikelbildung treten diese Kapsidprodukte als charakteristische zytoplasmatische Einschlüsse in Erscheinung.

Die Seroprävalenz differiert in Abhängigkeit von der geographischen Breite, vom Alter und vom sozialen Status. In den westlichen Industrienationen liegt die Prävalenz zwischen 40% und 79%, wohingegen die CMV-Seropositivität in den Entwicklungsländern mit 81% - 100% signifikant höher ist (Doerr und Schulz et al., 2002). Neben einer Tröpfcheninfektion über infizierte Zellen im Speichel sind seltener Schmierinfektion über virushaltiges Blut und Urin sowie eine Übertragung durch Muttermilch möglich. Da sowohl Samenflüssigkeit als auch Cervixsekret Viren enthalten, sind Sexualekontakte eine wichtige Infektionsquelle.

Das Maximum der Serokonversionsrate liegt zwischen dem 18. und 40. Lebensjahr. Bei immunkompetenten Individuen verläuft die Primär- bzw. die sporadisch reaktivierte

Infektion mit CMV in der Regel asymptomatisch. Nur in wenigen Fällen zeigt sich ein Mononukleose-ähnliches Beschwerdebild mit Fieber, Lymphknotenschwellung, schwacher Hepatitis.

Bei eingeschränkter Immunkompetenz sind Manifestationen häufiger und oft mit schweren Verläufen assoziiert.

Die Humanpathologie des CMV zeigt sich primär durch die vertikale Infektion von Feten oder Neugeborenen mit physiologisch unreifen Immunsystemen, die pränatal in der zweiten Hälfte der Schwangerschaft, perinatal oder postnatal über Brustmilch und Speichel erfolgt. Insbesondere im Rahmen einer pränatalen Transmission kann es je nach Entwicklungsstadium zu Schäden des Gehirns (Mikrocephalie, Meningoenzephalitis, zerebrale Verkalkung, mentale Retardierung), der Augen (Chorioretinitis) und des Gehörs (Taubheit) sowie zu Hepatosplenomegalie mit Ikterus kommen.

Im Rahmen der Transfusionsmedizin erlangte das CMV als Erreger der „Posttransfusionsmononukleose“, einhergehend mit einer interstitiellen Pneumonie, neuen Bekanntheitsgrad. Aufgrund der hohen Prävalenz unter gesunden Spendern (> 50%) geht die Transfusion von Blutprodukten mit einem hohen Infektionsrisiko einher, wobei die Infektiösität an die Leukozytenfraktion gebunden ist.

Insbesondere im Zeitalter der iatrogenen Immunsuppression nach Organtransplantation und der erworbenen Immunschwäche (AIDS) wurde das Cytomegalievirus unter den immunkompromittierten Personen zum gefürchteten Infektionserreger. Das CMV ist der häufigste virale Krankheitserreger bei Transplantatempfängern und verursacht meist im Rahmen einer endogenen Reaktivierung, seltener durch eine Primärinfektion bei CMV-positivem Transplantat, Pneumonien, ulceröse Enterokolitis, Hepatitis und sogar eine Abstoßung des Organs. Ähnliche Krankheitsbilder werden durch das Cytomegalievirus im Rahmen einer HIV-Infektion beobachtet und gehören zu den AIDS-definierenden Infektionen.

#### **3.2.4 Das Cytomegalievirus im Kontext der Rheumatoiden Arthritis**

Ein erster Anhaltspunkt für eine synoviale CMV-Infektion im Kontext der Rheumatoiden Arthritis findet sich in einem Fallbericht aus dem Jahr 1982. Kultivierte

Synovialzellen eines RA-Patienten ohne immunsuppressive Therapie und ohne klinische Manifestationen einer CMV-Infektion zeigten in vitro CMV-charakteristische cytopathische Effekte (Hamerman et al., 1982).

Es wurde bei RA-Patienten eine direkte Korrelation zwischen Präsenz von Anti-CMV-Antikörpern und RF dokumentiert (Ferraro et al., 1993). Zirkulierende RF konnten hierbei nur in Anwesenheit von Antikörpern gegen die Herpesvirenfamilie nachgewiesen werden. Ferner ging ein seropositiver RA-Status mit einem signifikant höheren CMV-Antikörpertiter einher. Peichl et al. entdeckten in einem seropositiven RA-Kollektiv selektive Bindungen der IgM-Rheumafaktoren an CMV-Antigene, was im Rahmen (Peichl et al., 1998) chronischer synovialer CMV-Infektionen als pathogenetischer Faktor zum Erhalt artikulärer Entzündungsreaktionen beitragen könnte.

Serologische Untersuchungen und Analysen der Synovialflüssigkeit von Patienten mit RA zeigten höhere CMV-Antikörpertiter als das gesunde Kontrollkollektiv (Musiani et al., 1987).

In einer Reihe von PCR-Studien ließ sich eine signifikant häufigere Präsenz von CMV-DNA im RA-veränderten Synovialkompartiment nachweisen (Murayama et al., 1992; Einsele et al., 1992; Stahl et al., 2000; Tamm et al., 1993). In Synovia-Proben detektierte die Arbeitsgruppe Murayama in 45% der RA-Fälle genomisches Material des humanen CMV und damit viermal häufiger als in einer Osteoarthritis-Kontrollgruppe, was sogar auf eine ätiologische Beziehung zwischen CMV und RA hinweist (Murayama et al., 1992). Der Verdacht auf eine isolierte, synoviale CMV-Infektion wurde durch höhere CMV-Titer in der Synovia als im Serum verstärkt. Somit wurde eine Beteiligung der CMV-Präsenz in der Synovialis und eine assoziierte lokale antivirale Immunantwort an der Pathogenese der Synovitis diskutiert (Einsele et al., 1992). Ferner wurde eine Assoziation zwischen erhöhten IL-8 und IL-6 Spiegeln und dem CMV-Genom-Nachweis via PCR dargestellt. Patienten mit RA und genomischer CMV-DNA in der Synovialflüssigkeit zeigten einen mindestens 10-fach erhöhten Interleukin-Spiegel (Murayama et al., 1994).

### 3.2.5 Epstein-Barr Virus (EBV)

Wie das Cytomegalievirus ist auch das Epstein-Barr Virus (HHV4) ein Vertreter der Familie der humanen Herpesviridae (HHV). Zunächst von Anthony Epstein und Yvonne Barr im Jahre 1964 als herpesvirusähnlicher Partikel im Rahmen der endemischen Burkitt-Lymphom-Forschung entdeckt, wurde es erst später von Gertrude und Werner Henle als neue Virusgattung identifiziert und nach seinen Entdeckern benannt. Erst einige Jahre später zeigte sich seine epidemiologische Bedeutung. Die Seroprävalenz in der Erwachsenen-Bevölkerung beträgt 95% (Modrow et al., 2003). Die Primärinfektion erfolgt als Kind bzw. als junger Erwachsener via Inkorporation infektiösen Speichels. Das Virus ist befähigt nach Erstinfektion lebenslang sowohl in einem latenten Stadium, seltener aber auch im Stadium einer lytischen Replikation zu persistieren. An der Eintrittspforte im Bereich des Oro- und Nasopharynx erfolgt rezeptormediiert die Infektion von CD 21-Protein-tragenden Epithelzellen und B-Lymphozyten. Während die lokalen Epithelzellen bevorzugt im Rahmen einer lytischen Replikation dem Zelluntergang unterliegen, dienen die B-Lymphozyten vor allem als Virusreservoir.

Mit steigendem Alter verläuft die EBV-Infektion bei Erstkontakt zunehmend mit klinischen Symptomen (Gärtner et al., 2002). Die häufigste klinische Manifestation bei primärer Infektion ist die infektiöse Mononukleose, auch bekannt als Pfeiffer'sches Drüsenfieber oder kissing disease. Der Krankheitsverlauf beginnt zunächst allgemeinsymptomatisch mit Fieber und einer Lymphadenopathie und ist im weiteren Verlauf von einer Pharyngitis sowie Tonsillitis geprägt. Meist ist erst der charakteristische Laborbefund von mononukleären Zellen und atypischen Lymphozyten diagnoseweisend. Es handelt sich hierbei um eine massive T-Zellreaktion auf virusreplizierende B-Lymphozyten. Durch eine replizierende EBV-Infektion werden B-Lymphozyten transformiert und beginnen zu proliferieren. Dieses unkontrollierte Wachstum wird durch EBV-spezifische, zytotoxische T-Lymphozyten gestoppt. Diese Immunreaktion findet in den charakteristischen Schwellungen lymphatischer Organe (Lymphknoten, Milz, Leber und Tonsillen) im Rahmen der infektiösen Mononukleose ihr klinisches Korrelat. Latent infizierte B-Lymphozyten entgehen dieser zellulären Abwehr, erfahren virusinduziert eine Immortalisierung und dienen als Virusreservoir (Bornkamm et al., 2001).

Sein tumorinduzierendes Potential wurde dem Epstein-Barr Virus durch seine strikte Assoziation mit dem in Afrika endemischen Burkitt-Lymphom (95%) (Modrow et al., 2003) und dem in Asien auftretenden Nasopharynxkarzinom (100%) (Gärtner et al., 2002) nachgewiesen. Eine generelle tumorigene Wirkung des EBV, im Sinne einer induzierenden Transformation und Immortalisierung der virusinfizierten Zellen, wird im Zusammenhang mit der Assoziation zu Adenotumoren des Magens und auch zu Hodgkin-Lymphomen diskutiert.

Neben der latenten Infektion und der Induktion einer Proliferation der infizierten B-Lymphozyten existiert noch eine dritte Variante der EBV-Wirt-Interaktion. Es besteht die Möglichkeit der Reaktivierung und des Übergangs in ein erneut produktives Stadium mit der Reinfektion des Wirtes (Bornkamm et al., 2001). Die Reaktivierung und auch unkontrollierte Proliferation infizierter Zellen basiert oftmals auf einer angeborenen, erworbenen oder iatrogenen Immunsuppression.

Die komplexen EBV-Wirt-Interaktionen (Latenz, Replikation und Reaktivierung) werden nicht nur durch das Immunsystem des Wirtes determiniert, sondern auch über ein virales Expressionsprogramm kontrolliert. Je nach Infektionsstatus sind unterschiedliche virale Struktur- oder Regulationsproteine nachweisbar.

Über immunhistochemische oder molekularbiologische Nachweisverfahren unterschiedlicher Latenz-, Replikations- oder Strukturproteine ist der Nachweis und die Charakterisierung des Aktivitätsstadiums einer EBV-Infektion möglich.

Im Latenzstadium beschränkt sich das Expressionsprogramm auf lediglich 2-10 Gene. Zwei Latenz-definierende Genprodukte sind das latent membrane Protein (LMP) und das Epstein-Barr nuclear Antigen (EBNA).

Das LMP-Antigen wird in die Zellmembran integriert und induziert phänotypische sowie funktionelle Veränderungen der latent-infizierten Zielzellen. Die Beeinflussung von Signalkaskaden mündet in einer Überexpression von anti-apoptotischen Faktoren (Bcl-2, Bfl-1, A20) (Henderson et al., 1991) sowie von Oberflächenmarkern (CD21, CD23, CD 40) (Wang et al., 1988; Wang et al., 1990). Zusätzlich löst LMP eine Freisetzung unterschiedlicher Cytokine (IL6, IL8, IL18) aus und reduziert die Ausbildung von Zelladhäsionsmolekülen (Li et al., 2003). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass LMP transformierendes und immortalisierendes Potential besitzt (Wang

et al., 1985). Eine direkte onkogene Wirkung des viralen Proteins konnte in vivo nachgewiesen werden (Kulwichit et al., 1998). Mit der Fähigkeit, Nagerfibroblasten zu transformieren, nimmt LMP1 unter allen EBV-Genprodukten eine Sonderstellung ein. (Yang et al., 2000; Mainou et al., 2005)

Unter EBNA (Epstein-Barr nuclear antigen) wird eine Gruppe von sechs differenten Kernantigenen (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C und – LP(leader protein)) zusammengefasst. Aufgrund ihrer unabhängigen Expressionszeiten und unterschiedlichen Funktionen während der Latenzphase werden über EBNA-Proteinexpressionsmustern drei Latenzstadien definiert. Während der latenten Infektion liegt das virale Genom meist als Episom, d.h. als lineares Ringmolekül vor. Mit der Expression von EBNA-1 in der Latenzphase 1 wird die Replikation der episomalen Virus-DNA induziert. Das Latenzstadium 2 wird durch den zusätzlichen Nachweis von LMP bestimmt. Das Expressionsmuster des Stadiums 3 beinhaltet die Präsenz aller weiteren Genprodukte der EBNA-Familie. EBNA 2 bewirkt über seine transaktivierende Wirkung auf die LMP- und EBNA-Promotoren eine vermehrte Expression dieser Genprodukte. Die Proteine der EBNA 3-Generation sind essentiell für die B-Zell-Immortalisierung (Tomkinson et al., 1993) und steuern virale und zelluläre Promotoren (Allday et al., 1993; Sillins et al., 1994). Unter diagnostischen Gesichtspunkten sind serologisch spezifische EBNA-Antikörper relevant. Bis auf EBNA 1 werden alle EBV-Genprodukte, insbesondere die EBNA 3- und LMP-Proteine, auf MHC I-Molekülen präsentiert und lösen eine zytotoxische T-Zell-Antwort aus (Levitskaya et al., 1995; Rickinson et al., 1996).

Sowohl im Latenzstadium als auch in der lytischen Phase werden zwei nicht-translatierte virale RNAs, die EBER1- und EBER2-Moleküle, synthetisiert. Diese EBV-encoded small RNAs (EBER1 und 2) sind Transkripte mit einer Basenpaarlänge von 166 bzw. 172 Nukleotiden und liegen in einer Kopienanzahl von bis zu  $10^7$  pro Wirtszelle vor. Die nicht-polyadenylierten Nukleinsäuren liegen assoziiert mit zellulären Proteinen (LA: lupus antigen, EAP: EBER assoziiertes Protein, RNP: Ribonukleoprotein) im Nukleus oder Zytoplasma vor. Die EBER1- und 2-Transkripte blockieren Interferon-induzierte Abwehrmechanismen und schützen vor Apoptose. Einhergehend mit einem Verlagern der Transkripte vom Zellkern in das Zytoplasma, verändert sich das EBER1/EBER2-Verhältnis beim Übertritt von Latenzphase zur

lytischen Replikation. Die Detektion dieser EBER-Moleküle mittels *in situ*-Hybridisierung gilt als das sensitivste Verfahren zum Nachweis einer EBV-Infektion.

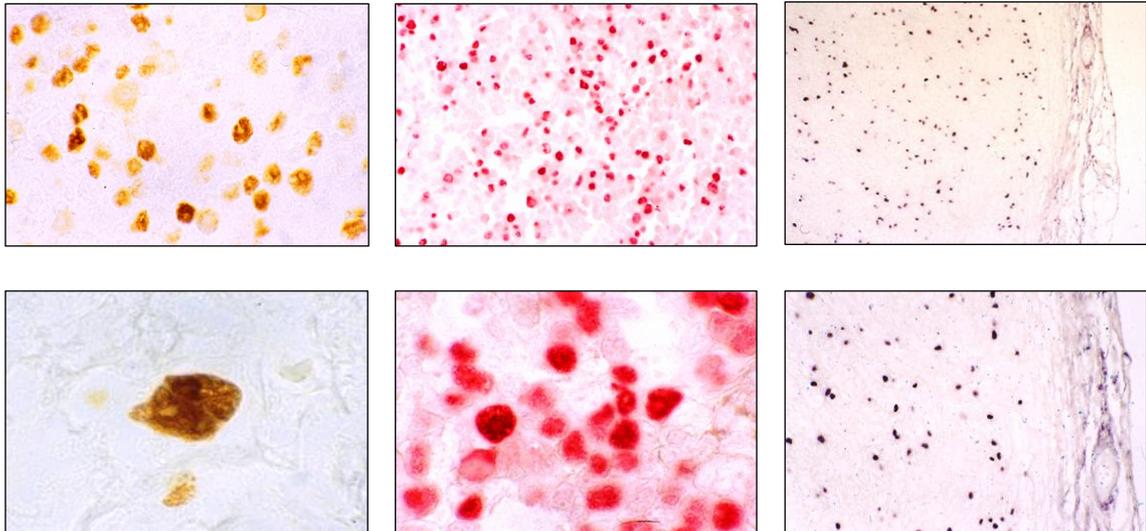


Abbildung 3 Beispiele der EBER-*in situ*-Hybridisierung (ISH) an den eingesetzten Positivkontrollen; EBV-positive Tonsille bei infektiöser Mononukleose (IM) und EBV-positives Hodgkin Lymphom (HL)

A1) EBER-1 und -2-ISH mit DAB Färbung an Tonsille bei IM

A2) EBER-1 und -2-ISH mit DAB Färbung an HL, zeigt eine pathognomonische Sternberg-Reed-Riesenzelle

B1,B2) EBER-1 und -2-ISH mit Fuchsin Färbung an Tonsille bei IM

C1,C2) EBER-1 und -2-ISH mit NBT Färbung an HL

Die Faktoren, die den Wechsel von einer etablierten latenten Infektion zu einer lytischen Replikation induzieren sind unbekannt. Der Aktivitätswechsel geht mit einer sequentiellen Expression von über 100 viralen Genen einher. Nach dem zeitlichen Auftreten werden die Genprodukte als Immediate-Early-, Early- und Late-Proteine klassifiziert. Die Immediate-Early-Proteine regulieren die Bildung der Early-Eiweiße, welche mehrheitlich Enzyme, wie z.B. Kinasen und Polymerasen, darstellen. Diese katalysieren in der Folge die Prozesse zur Ausbildung der Strukturproteine (Late Proteine). Ein Schlüsselgen in der lytischen Vermehrung codiert das Immediate-Early-Protein BZLF-1. Eine Blockade oder Aktivierung dieses Gens entscheidet über Latenz bzw. lytische Replikation und steht somit an der Spitze der Kaskade zur lytischen Infektion. Das Transaktivatorprotein BZLF1 bindet an den lytischen Replikationsursprung (*oriLyt*), dem Ursprung der DNA Replikation (Countryman et al., 1985; Hammerschmidt et al., 1988).

### **3.2.6 Das Epstein-Barr Virus als kausatives oder pathogenetisches Agens im Kontext der Rheumatoiden Arthritis**

Der Nachweis einer gesteigerten humoralen Antwort auf EBV-Antigene (EA, VCA, EBNA) bei Patienten mit RA deutete in den 80er-Jahren erstmals auf eine Assoziation zwischen EBV und RA.

Alspaugh et al. zeigte durch Präzipitations-Reaktionen an Lymphozyten im Jahre 1976, dass das Serum von Patienten mit RA hohe Antikörpertiter gegen ein zelluläres Antigen aufweisen, welches primär als RAP (rheumatoid arthritis precipitin), später aufgrund seiner nukleären Lokalisation als RANA (Rheumatoid Arthritis nuclear Antigen) und schließlich als EBNA (Epstein-Barr nuclear Antigen) bezeichnet wurde (Alspaugh et al., 1976; Cohen et al., 1982; Veneables et al., 1988; Billings et al., 1983). Im Jahre 1978 konnte gezeigt werden, dass das Auftreten des RANA streng mit einer EBV-Infektion und einer Transformation der Lymphozyten assoziiert ist (Alspaugh et al., 1978); dementsprechend zeigten Serum- und Synovialanalysen von RA-Patienten erhöhte EBV-Antikörpertiter (Alspaugh et al., 1981; Ferrell PB et al., 1981). Mit Antikörpern reaktiv zu EBNA, viral capsid antigen (VCA) und early Antigen (EA) wurden hierbei sowohl latente als auch replikative EBV-Antigene nachgewiesen. Interessanterweise zeigen explizit EBNA1-spezifische Antikörper eine starke Reaktivität zu Synovial lining-Zellen in RA-Gelenken. Antikörper gegen EBNA1 zeigten eine Kreuzreaktivität zu einem 62 kDa-Protein im Synovium von RA-Patienten (Fox et al., 1986; Costenbader et al., 2006). Diese Verflechtung von EBNA und RANA unterstützte die These einer autoimmunologischen Kreuzreaktion in der Pathogenese der Erkrankung.

Ein HLA-DR4-Trägerstatus wurde als genetische Disposition zur Entwicklung der RA identifiziert. Das Glykoprotein GP 110, eine Komponente des EBV-Capsid-Proteins, zeigt eine homologe Aminosäuresequenz zum HLA-DR4-Epitop, dem RA-Risiko-Allel (Roudier et al., 1988; Ollier et al., 2000). Das EBV-GP 110 weist das QKRAA-Motiv (shared epitope) auf und stellt somit eine weitere molekulare Verbindung zwischen EBV und RA her. Die QK/RRAA-Sequenz wurde als eines der hauptsächlich immunogenen EBV-Epitope charakterisiert; dieser Befund trug zur Etablierung der „molecular mimicry“-Hypothese in der RA-Pathogenese bei. Gesunde Individuen

entwickeln nach einer EBV-Infektion sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort, die gegen das GP 110 gerichtet ist. Die Zahl der GP 110-spezifischen T-Zellen wird von der individuellen Ausstattung der HLA-DR-Allele beeinflusst (Toussiro et al., 1999). Träger des RA-„protektiven“ HLA-DRB1\*07-Allels wiesen eine hohe Zahl GP110-spezifischer T-Zellen auf. Bei Expression des RA-Risikoallels HLA-DRB1\*0404 zeigte sich hingegen eine geringe GP110-spezifische T-Zell-Population. Umgekehrt korreliert die Schwere der RA mit einer geringen EBV-GP110 T-Zell-Antwort. Je weniger GP110-spezifische T-Zellen existieren, desto mehr extra-artikuläre Manifestationen sind zu beobachten (Toussiro et al., 2000).

Gegenüber gesunden Individuen weisen Patienten mit Rheumatoider Arthritis unabhängig vom HLA-Polymorphismus eine auf das EBV limitierte Störung in der B- und T-Zell-Immunantwort auf. Untersuchungen verschiedener T-Zell-Funktionen zeigten bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis eine defekte EBV-spezifische T-Suppressorzellfunktion (Balandraud et al., 2004; Tosato et al., 1981). In vitro waren zur Unterdrückung auswachsender, EBV infizierter B-Zellen mehr T-Zellen von Patienten mit Rheumatoider Arthritis erforderlich als von gesunden Individuen. Die EBV-charakteristische Persistenz stellt potentiell einen permanenten Stimulus für das Immunsystem mit entsprechender Globulinproduktion dar.

Neben serologischen und immunologischen Aspekten ließ der lokale Nachweis von EBV im RA-Synovialgewebe bzw. RA-Synovialflüssigkeit eine potentiell weitere - direkte - Beteiligung von EBV bei der RA-Genese vermuten. Während PCR-basierte Analysen wiederholt EBV-DNA aus RA-Gelenken identifizierten (Blaschke et al., 2000; Saal et al., 1999; Stahl et al., 2000; Takeda et al., 2000; Zhang et al., 1993; Edinger et al., 1999), zeigten nicht amplifizierende Untersuchungen (EBER-Nachweis) kontroverse Ergebnisse (Niedobitek et al., 2000; Blaschke et al., 2000; Brousset et al., 1993).

### **Zusammenfassung einer möglichen Virusätiogenese im Rahmen der RA**

Die Vielzahl der obig dargestellten Befunde zu Parvovirus B19, EBV und CMV im Hinblick auf ihre mögliche Beteiligung bei der Ätiogenese der RA lassen sich im Wesentlichen zwei Aspekten zuordnen. Zum einen den Daten, die eine systemische Beteiligung des jeweiligen Virus vermuten lassen (z.B. serologische Befunde, z.B. Sequenzhomologie zu humanen HLA-Proteinen), was auf eine autoimmunologische Kausa bzw. immunologische Kreuzreaktivitäten in der RA-Entstehung schließen lässt. Zum anderen weisen direkte Virusnachweise im RA-Gelenk bzw. der RA-Synovialflüssigkeit auf die Möglichkeit eines lokalen Virusinfektes der Gelenkschleimhaut hin (z.B. synoviale PCR-Virus-DNA-Nachweise). Ein eindeutiger Beleg für einen der beiden Modi ist nach wie vor nicht erbracht. Grundsätzlich wäre auch ein kombinierter Einfluss sowohl systemischer als auch lokaler viraler Infektionen denkbar. Insbesondere der Nachweis lokaler synovialer Virusinfektionen (Stahl et al., 2000; Saal et al., 1992; Saal et al., 1999; Murayama et al., 1992; Einsele et al., 1992; Sawada et al., 2005; Takei et al., 1997; Takeda et al., 2000) muss jedoch differenziert betrachtet werden. Im Vorfeld erstellte, überwiegend PCR-basierte Studien verschiedener Arbeitsgruppen erbrachten z.T. kontroverse Befunde (Nikkari et al., 1994; Brousset et al., 1993; Kerr et al., 1995; Mousavi-Jazi et al., 1998; Tamm et al., 1993; Niedobitek et al., 2000). Aufgrund der methodisch inhärenten hohen Sensitivität der amplifizierenden PCR-Methode ist zudem eine klare Quantifizierung der nachgewiesenen viralen Nukleinsäuren schwierig. Eine relevante Dosis viraler DNA kann nur bedingt von akzidentell vorhandenen DNA-Sequenzen (z.B. durch Einschleppung im Rahmen der Immigration von Entzündungszellen) differenziert werden. Ohne histomorphologischen Bezug erlaubt dieses Nachweisverfahren weiterhin keine Zuordnung der fraglich infizierten Zellen, so dass im Falle eines positiven Nachweises nicht zwischen einer eigentlichen Infektion der Synovialis und Immigration Virus-tragender Entzündungszellen (z.B. EBV-positiver B-Reservoir-Zellen) unterschieden werden kann.

### 3.3 Fragestellung und Zielsetzung

Vor dem genannten Hintergrund sollte die Frage einer relevanten lokalen Virusinfektion des Synovialgewebes im Rahmen der RA geklärt werden. Die Studie fokussiert sich hierbei auf synoviale Infektionen durch Parvovirus B19, EBV und CMV.

Der fragliche Nachweis einer entsprechenden Virusinfektion sollte durch Detektion viraler Nukleinsäuren (RNA bzw. DNA) sowie viraler Proteine erfolgen. Hierzu wurden arthritische Synovialgewebe von Autoimmunarthritis (überwiegend RA) sowie als Kontrollkollektiv Fälle von reaktiven, chronischen Arthritiden/Synovitiden und wenige normale Synovien unter Anwendung nicht amplifizierender (im Gegensatz zu PCR-Analyse), *in situ*-Detektionsverfahren (RNA- und DNA- *in situ*-Hybridisierung sowie Immunhistochemie) analysiert. Unter den Autoimmunarthritis wurden einige Psoriasis-Arthritis (PSA)-Fälle eingeschlossen. Aufgrund großer klinischer und histomorphologischer Ähnlichkeit der PSA zur RA wären bei beiden Entitäten analoge, pathogenetische Mechanismen denkbar.

1. Zur Erfassung einer EBV-Infektion diente eine EBER1/2-RNA-*in situ*-Hybridisierung. Der Nachweis einer CMV-Infektion erfolgte über CMV-DNA-*in situ*-Hybridisierung. Ein Parvovirus B19-Nachweis wurde bei fehlender Latenz-Entwicklung des Virus über eine immunhistochemische Analyse eines Virus-Strukturproteins (VP1/2) geführt.

Im Falle eines positiven Virusnachweises waren nachfolgend weiterführende Untersuchungen geplant (siehe 2. bzw. 3.).

2. Um eine eigentliche Infektion der Synovia zu belegen, sollte der virale Zelltropismus, d.h. eine Unterscheidung zwischen ortsständigen Synoviozyten versus infiltrierenden Lymphozyten als virale Zielzellen, untersucht werden. Die Identifizierung bzw. Charakterisierung Virus-positiver Zellen erfolgte nach histo-zytomorphologischen Kriterien bzw. mittels immunhistochemischer Zelltypisierung.

3. Um die Analyse des Infektionsstatus zu komplettieren, sollte für EBV und CMV, die beide sowohl ein latentes als auch replikatives Stadium des Infektionszyklus zeigen können, die jeweilige virale Aktivität anhand der Detektion phasenspezifischer Virusproteine bestimmt werden.



## **4 Material und Methoden**

### **4.1 Gewebematerial**

Die Untersuchungen zur Assoziation von Parvovirus B19, CMV und EBV an der Genese der Rheumatoiden Arthritis wurden an Paraffinschnitten durchgeführt. Das betrachtete Kollektiv umfasst Synovialis-Proben von 63 Patienten. Das Gewebematerial wurde überwiegend vom Institut für Pathologie und von der Klinik für Orthopädische Chirurgie der Universität des Saarlandes, Homburg, bezogen. Weitere Fälle wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie des Zentralklinikums Augsburg, mit der Klinik für Orthopädie des Bundesknappschafts-Krankenhauses in Püttlingen und mit der Klinik für Rheumaorthopädie des Rheumazentrums Oberammergau akquiriert. Aus diagnostischer oder therapeutischer Indikation wurden die Synovialgewebe entweder im Rahmen arthroskopischer oder chirurgischer Eingriffe gewonnen.

Das Patientengut schließt 29 Fälle mit Rheumatoider Arthritis (RA), 6 Fälle mit Psoriasis-Arthritis (PSA), 26 Fälle mit chronisch reaktiver Synovitis bzw. Arthritis (rA/S) und 2 Fälle mit unveränderter, normaler Synovialis (nS) ein.

In vivo ist aufgrund der Invasivität und der postinterventionellen Risiken eine Gewebeentnahme aus einem völlig gesunden Gelenk ohne Indikation nicht zu rechtfertigen. Post mortem hingegen bestehen altersbedingt meist degenerative Veränderungen der Gelenke. Aufgrund der schwierigen Akquisition von unveränderter Synovialis berücksichtigt das untersuchte Kollektiv lediglich 2 Normalfälle. Eine Gewebeprobe wurde bei der diagnostischen Arthroskopie einer traumatischen Gelenkläsion entnommen, eine zweite wurde im Rahmen einer Autopsie vom Institut für Rechtsmedizin der Universität des Saarlandes, Homburg, bereitgestellt.

Während die RA und die PSA klassische Vertreter der Autoimmunarthritis darstellen, setzt sich die Vergleichsgruppe aus chronisch reaktiven Arthritiden zusammen.

Tabelle 2 Zusammensetzung des Untersuchungskollektivs nach klinischer Diagnose, Anzahl und Geschlecht

Klinische Diagnose	RA	PSA	rA/S	nS	
Anzahl der Fälle	29	6	26	2	Σ 63
Aufteilung nach Geschlecht	20 ♀ 9 ♂	6 ♂	14 ♀ 12 ♂	1 ♀ 1 ♂	

*RA, Rheumatoide Arthritis; PSA, Psoriasis Arthritis; rA/S, reaktive Arthritis/Synovitis; nS, normale Synovia; ♂, männlich; ♀, weiblich;*

Die als chronisch reaktive Synovitis bzw. Arthritis zusammengefassten Fälle rekrutieren sich aus Gewebeproben von Patienten mit den folgenden Diagnosen: Osteoarthritis, Detritus-Arthritis, chronische Irritation nach Gelenkverletzung oder unklare chronische Synovitis. Eine detaillierte Übersicht der einzelnen Fälle bzgl. Alter, Geschlecht, Präparatnummer und Diagnose zeigt Tabelle 16 im Anhang.

Die Kriterien für die Diagnose einer Rheumatoiden Arthritis bzw. einer Psoriasis-Arthritis basieren auf den klinischen und histopathologischen Vorgaben des American College of Rheumatology (ACR; ehemals American Rheumatism Association ARA). Die Diagnose einer reaktiven Arthritis ist hingegen als Ausschlussdiagnose zu verstehen. Spezifische und systemische Arthritisformen müssen durch klinische, histologische oder serologische Untersuchungen ausgeschlossen werden. Insbesondere dürfen die diagnostischen Kriterien für die Manifestation einer Rheumatoiden Arthritis oder Psoriasis Arthritis nicht erfüllt sein.

Die Gewebeproben wurden mit abnehmender Häufigkeit aus Knie-, Hüft-, Karpal- oder Tarsalgelenken entnommen. Bei der Mehrzahl der Fälle handelte es sich um archivierte Paraffinblöcke der jeweiligen Institute. Nativmaterial wurde zunächst in 4% Formalin fixiert und anschließend mittels pathologischen Routineverfahren in Paraffin eingebettet. Um ein späteres Arbeiten mit RNA zu ermöglichen, erfolgte die weitere Herstellung der Gewebeschnitte unter Vermeidung einer zusätzlichen RNase-Kontamination. Die Gewebelöcke wurden auf 5µm Dicke zugeschnitten und anschließend auf RNase-freie, silanisierte Objektträger aufgezogen.

## 4.2 Positivkontrollen

### 4.2.1 EBV-Positivkontrollen

Als Positivkontrolle für eine EBV-Infektion diente einerseits Paraffin-eingebettetes Gewebe eines EBV-positiven Hodgkin-Lymphoms mit histologischem Nachweis zahlreicher Hodgkin-Zellen und Sternberg-Reed-Zellen. Als nicht malignes Kontrollpräparat wurde andererseits Tonsillengewebe mit infektiöser Mononukleose verwendet. Das Material wurde freundlicherweise von Prof. Schmidt-Gräf (Institut für Pathologie, Freiburg) zur Verfügung gestellt.

### 4.2.2 CMV-Positivkontrolle

Als Kontrollgewebe für einen CMV-Befall wurde Paraffin-eingebettetes Lungengewebe mit histomorphologischen Veränderungen einer CMV-Pneumonie eines Patienten mit HIV-Infektion als Grundleiden verwendet. Die Diagnosestellung und auch die Gewebebereitstellung erfolgten durch das Institut für Pathologie der Universität des Saarlandes (Prof. Dr. Remberger).

### 4.2.3 Parvovirus B19-Positivkontrolle

Sowohl die Austestung als auch die Versuchskontrollen des verwendeten monoklonalen VP1 / VP2-Antikörpers erfolgten an Nierengewebe eines hydropisch abortierten Feten. Die Parvovirus B19-Positivität des Gewebes wurde in früheren Analysen mittels *in situ*-Hybridisierung von Frau PD Dr. Mehraein nachgewiesen (Mehraein et al., 1991).

## 4.3 Negativkontrollen

Zum Ausschluss falsch-positiver Ergebnisse wurden für jede der drei Virusanalysen Negativkontrollen durchgeführt. Sie dokumentieren die Spezifität der jeweiligen Nachweisverfahren (Immunhistochemie oder *in situ*-Hybridisierung). Hierzu wurden die etablierten Protokolle an Positivkontroll- sowie Arthritisgeweben ohne Einsatz des Primärantikörpers bzw. ohne Sondeneinsatz durchgeführt. Zusätzlich wurden im Rahmen der EBV-Analyse zur Negativkontrolle der EBER-RNA-*in situ*-Hybridisierung EBER 1/2-sense-Sonden eingesetzt. Erwartungsgemäß zeigten alle Versuchsreihen weder unter den Positivkontroll-Geweben noch unter den Arthritisgeweben spezifische Signale.

## 4.4 Silanisierung von Objektträgern

Da die Gewebeschnitte u.a. zur RNA-*in situ*-Hybridisierung verwendet wurden, mussten bereits bei der Vorbehandlung der Objektträger die Gütekriterien des RNase-freien Arbeitens erfüllt werden. Die Objektträger wurden nur mit Handschuhen berührt und in hitzebehandelten Glasschaukeln geschichtet. Zur Elimination von Verunreinigungen, Keimen und auch präexistenter RNase wurden die Schaukeln einer jeweils 30-minütigen Behandlung mit 100% Chloroform und nachfolgend 100% Ethanol unterzogen. Nach erfolgter Lufttrocknung wurden die Glasschaukeln in 2 % Silanlösung (5 ml Silan [3-Triethoxysilylpropylamin] in 250 ml Aceton) für 5 min eingestellt.

Nach kurzen Waschschritten in Aceton und aqua dest. stehen die OT nach Trocknung im Wärmeschrank bei 40°C zur Verwendung bereit.

## 4.5 DNase- und RNase-freies Arbeiten

### 4.5.1 DNase-freies Arbeiten

Um eine Kontamination mit DNA während der DNA-*in situ*-Hybridisierung zu vermeiden, wurden Pipettenspitzen aus der Verpackung auf eine saubere Unterlage geschüttet und mit Handschuhen gesteckt. Weiterhin wurden die Pipettenspitzen und Eppendorftubes vor Gebrauch autoklaviert, um Keime zu eliminieren und um DNase zu reduzieren. Da die Haut eine wesentliche Quelle für DNase-Kontamination darstellt, sollten während der Versuche aber auch schon bei Versuchsvorbereitung Handschuhe getragen werden. Auch die Herstellung der zu verwendenden Lösungen erfolgte unter diesen Sicherheitsmaßnahmen. Die gebrauchten Chemikalien wurden ausgeschüttet. Als Reaktionsgefäße wurden Einmalplastikgefäße oder hitzebehandelte Glasgefäße (200°C, > 6 h) verwendet, sowie Lösungen vor Gebrauch autoklaviert.

### 4.5.2 RNase-freies Arbeiten

Im Vergleich zur DNA ist RNA sehr anfällig für spontane und insbesondere für enzymatisch-katalysierte Hydrolysen. Eine besondere Kontaminationsgefahr geht von der ubiquitär vorkommenden RNase aus. Neben den Laborrichtlinien für DNase-freies Arbeiten sind deshalb weitere Vorsichtsmaßnahmen zu treffen (Maniatis et al., 1989).

Generell besteht Handschuhpflicht, da die Haut eine Hauptkontaminationsquelle für RNase darstellt. Den Standardempfehlungen folgend wurden für das Arbeiten mit RNA gesondert Chemikalien verwendet und diese manuell ausgeschüttet. Zur RNase-Inaktivierung steht neben einer Hitzeinaktivierung, die Verwendung des RNase-Inhibitors Diethylpyrocarbonat (DEPC) zur Verfügung. Alle hitzestabilen Glaswaren, Metallobjekte (Pinzetten, Flaschenverschlüsse) und Rührfische wurden vor Gebrauch in Alufolie eingeschlagen und über Nacht im Trockenschrank bei 200°C hitzebehandelt. Lösungen wurden mit sterilem Ampuva-H<sub>2</sub>O oder mit 0,1% DEPC-H<sub>2</sub>O angesetzt. Wird DEPC zur Eliminierung der RNase eingesetzt, sollten zur Wirkooptimierung die Lösungen bei 37°C für 12 Stunden inkubiert werden. Nachfolgend ist eine Zersetzung des kanzerogenen DEPC durch Autoklavieren oder durch Hitzebehandlung bei 100°C für 15 min erforderlich. Bereits bei der Herstellung der Objektträger wurde versucht, RNase-frei bzw. RNase-reduziert zu arbeiten. Hierzu wurden die OT durch trockene Hitze sterilisiert und RNase-frei silanisiert. Ein frequenter Wechsel der Mikrotomklingen sollte eine endogene Verunreinigung mit RNase aus den Paraffinblöckchen möglichst gering halten. Um präexistente RNase im Wasserbad des Mikrotoms zu inhibieren, erfolgten eine Reinigung des Wasserbeckens mit Chloroform sowie eine Neubefüllung mit DEPC-H<sub>2</sub>O.

#### **4.6 *in situ*-Hybridisierung**

Die im Jahre 1969 etablierte Methode der *in situ*-Hybridisierung erlaubt den Nachweis von Nukleinsäuren (DNA oder RNA) genomischen, aber auch viralen Ursprungs, auf Zellebene am histologischen Schnittpräparat (*in situ*). Die target-DNA bzw. -RNA wird mit Hilfe markierter, komplementärer DNA- oder RNA-Sequenzen (Sonden) detektiert, indem Target und Sonde sich als Einzelstränge zu einem neuen Doppelstrang assoziieren, d.h. ein Hybridmolekül bilden. Je nach Charakter von Ziel- und Sondennukleinsäure entstehen DNA/DNA-, RNA/RNA- oder als Mischform DNA/RNA-Hybride. Nach erfolgter Hybridisierung werden die markierten Sonden durch eine Kombination aus spezifischem Antikörper und Enzym-vermittelter Chromogenreaktionen (ähnlich der Immunhistochemie) oder bei ausreichender Sondengröße direkt mit Fluoreszenz-Farbstoff-konjugierten Sonden (FISH) visualisiert. Die ISH ist die einzige Methode, die eine zelluläre Lokalisation der DNA oder RNA

erlaubt und zudem Aussagen über die Zellmorphologie oder den Zelltyp ermöglicht. Ein weiterer Vorteil der ISH besteht in ihrer Spezifität, die im Vergleich zur Immunhistochemie nicht nur höher ist, sondern auch durch Veränderungen der Hybridisierungsparameter kontrolliert werden kann. Ein Kernparameter stellt die Hybridisierungstemperatur dar. Die Assoziation zweier Nukleinsäurestränge wird über die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen stabilisiert. Mit zunehmender Temperatur beginnen sich Doppelstränge zu lösen und ab einem bestimmten Temperaturniveau liegen nur noch Einzelstränge vor. Durch Reduzierung der Temperatur induziert man eine erneute Reassoziierung der Nukleinsäurestränge. Kenngröße für diesen dynamischen Prozess ist die Schmelztemperatur  $T_M$ . Sie beschreibt die Temperatur bei der 50% eines definierten Doppelstranges in Form von Einzelsträngen vorliegen. Diese Schmelztemperatur ist abhängig von verschiedenen Faktoren. Sie nimmt mit zunehmender Länge der Nukleinsäuren sowie mit hohem Guanin-Cytosin- gegenüber Adenosin-Tymin-Basenanteil zu. RNA/RNA-Hybride sind stabiler, d.h. sie haben eine höhere Trenntemperatur als DNA/DNA-Moleküle, DNA/RNA-Moleküle nehmen eine Zwischenposition ein. Generell gilt: Je höher die Homologie der assoziierten Stränge, desto höher die Schmelztemperatur; mit zunehmendem Anteil an falschen Basenpaarungen erniedrigt sich  $T_M$ . Weiterhin beeinflussen chemische Faktoren die Stabilität der Hybridisierung bzw. die Doppelstrangbildung. Niedriger Salzgehalt der Lösung und bestimmte destabilisierende Agenzien wie Formamid senken die Schmelztemperatur. Mittels Gleichungen, die die oben genannten Parameter berücksichtigen, lassen sich theoretisch ideale Hybridisierungstemperaturen berechnen. Ein idealer Temperaturbereich liegt zwischen  $T_M'$  und  $T_M$ , wobei  $T_M'$  die Schmelztemperatur von unspezifischen Reassoziierungen und  $T_M$  die Schmelztemperatur der spezifischen Paarung mit absoluter Homologie beschreiben. Als Kompromiss zwischen einem theoretischen Stringenzoptimum und temperaturbedingter Hitzedenaturierung einerseits sowie empirischen Erkenntnissen bzgl. des Verhältnisses von Signal zu Hintergrund andererseits wird  $T_M - 25^\circ\text{C}$  als optimale Hybridisierungstemperatur angesehen. Um das Maß der spezifischen Assoziationen zu erhöhen, führt man post-Hybridisierungswaschungen bei hoher Stringenz durch, d.h. unter Bedingungen, denen nur hochkomplementäre Paarungen standhalten.

### 4.6.1 EBER 1 und EBER 2-RNA-*in situ*-Hybridisierung

Die Vorteile einer RNA-Sonde bestehen in der hohen Stabilität der RNA-Hybride und in der fehlenden absoluten Notwendigkeit einer Denaturierung vor Sondeneinsatz. Weiterhin besteht keine Gefahr einer reinen Sondenreassoziaton während der Hybridisierung. Ferner können durch eine RNase-Behandlung post Hybridisierung nicht spezifisch assoziierte Sonden verdaut werden. Der größte Nachteil bei Verwendung von RNA-Sonden zeigt sich in der permanenten Gefahr der Degradation durch ubiquitäre RNase und die konsekutiv notwendige Sorgfalt im Umgang mit der Sonde (siehe RNase-freies Arbeiten).

#### Herstellung der EBER 1 und EBER 2-RNA-Sonden

Markierte RNA-Sonden lassen sich mittels *in vitro*-Transkription geeigneter klonierter DNA-Fragmente erzeugen. Entsprechende Transkriptionsvektoren mit klonierter EBER1- und EBER2-cDNA wurden von Prof. Friedrich Grässer (Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Abteilung Virologie, Universität des Saarlandes, Homburg) freundlicherweise bereitgestellt. (weitere Informationen bezüglich der verwendeten Transkriptionsvektoren pBSJJ1 und pBSJJ2 finden sich im Anhang)

Die Klonierungssequenz des jeweiligen Vektors ist von Promotoren für die T3- bzw. T7-RNA-Polymerase flankiert (siehe Abb. 4 und 5). Die entsprechende RNA-Polymerase verwendet die klonierte Sequenz als „template“ (Matrize) und erzeugt durch *in vitro*-Transkription in obligater 5'-3'-Richtung eine komplementäre RNA-Sequenz. Dieses transkribierte Oligonukleotid kann als hochspezifische RNA-Sonde für das Klonierungsfragment eingesetzt werden. Template und Transkriptionsprodukt verhalten sich komplementär zueinander. Entspricht die Basensequenz der *in vivo* existierenden mRNA-Sequenz, wird der Nukleotidstrang als Sense bezeichnet; stellt der Nukleotidstrang die komplementäre Basensequenz dar, wird er als Antisense definiert. Folglich lässt sich der Nachweis eines *in vivo* gebildeten mRNA-Produktes nur durch den Einsatz der Antisense-Sonde führen. Um Run-around-Transkripte, d.h. um eine Amplifikation des gesamten Vektors, zu verhindern und um die Amplifikation auf das klonierte Fragment zu limitieren, muss der Vektor stromabwärts der klonierten Sequenz mittels eines Restriktionsenzym geschnitten und somit das Plasmid linearisiert werden.

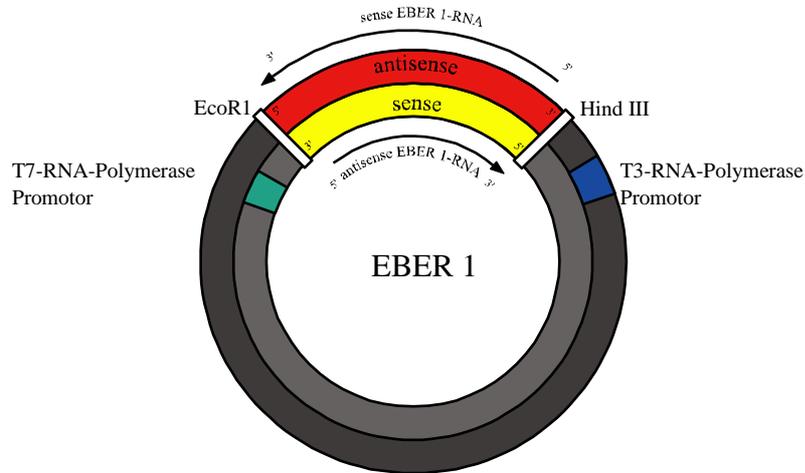


Abbildung 4 schematische Darstellung des Vektors pBSJJ1 mit klonierter EBER 1 cDNA

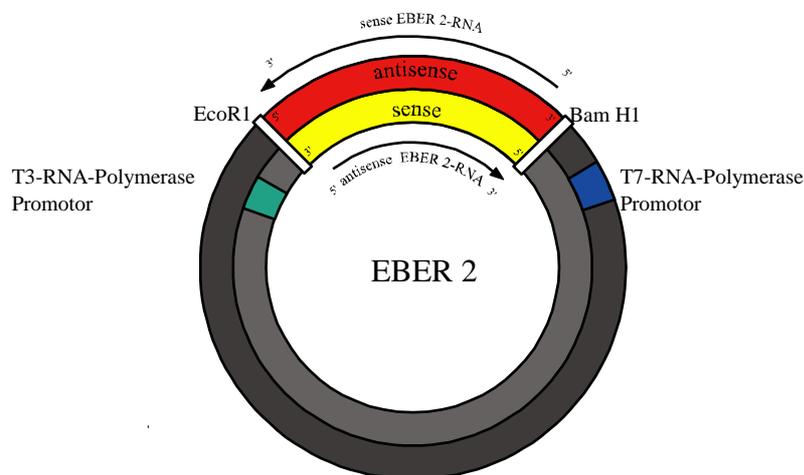


Abbildung 5 schematische Darstellung des Vektors pBSJJ2 mit klonierter EBER 2 cDNA

### Linearisierung der Vektor-DNA

Das >Kurzschemata A des Anhangs< zeigt die Pipettierschemata für die Linearisierung der Transkriptionsvektoren. Im jeweiligen Reaktionsansatz werden 2 µg Plasmid-DNA im Überschuss mit 15 Units eines Restriktionsenzymes (*EcoR1*, *HindIII*, *BamH1*) im enzymespezifischen 1x-Reaktionspuffer bei 37°C im Wasserbad über Nacht inkubiert. Da es sich bei dem Reaktionsprodukt um ein RNA-Molekül handelt, sind unbedingt die Laborrichtlinien für RNase-freies Arbeiten im Rahmen der Linearisierung, aber auch für die weitere Sondenherstellung zu beachten.

Zur Kontrolle der Vollständigkeit der Linearisierung erfolgte eine Längenbestimmung der einzelnen Fragmente im Vergleich zu ungeschnittener Vektor-DNA und zu DNA-Fragmenten definierter Größe (200 bp und 1000 bp) mittels Gelelektrophorese. Dazu wurde 1% Agarose in TBE Puffer (0,5g in 50 ml 1x TBE) durch Mikrowellenbehandlung gekocht, nach Abkühlen mit 5 µl Ethidiumbromid [1mg/ml] versetzt und als Gel gegossen.

In die Geltaschen [3], [4], [6] und [7] wurde ein Volumen von 10 µl, bestehend aus 3 µl Vektor-DNA nach Restriktionsenzymbehandlung, 1 µl Gelladepuffer II und 6 µl aqua dest., eingebracht. Auf der Taschenhöhe [2] bzw. [5] lief eine 1 µl Probe des ungeschnittenen Transkriptionsvektors in 1 µl Gelladepuffer und 8 µl aqua dest. Zur Größenorientierung wurden definierte Molekulargewichtsmarker von 1000 bp [1] bzw. 200 bp [8] verwendet. Die unterschiedliche sterische Ausdehnung des ungeschnittenen Ringmoleküls im Vergleich zum linearisierten Plasmid sollte unterschiedliche Laufgeschwindigkeiten bedingen und sich in unterschiedlichen Bandenhöhen niederschlagen.

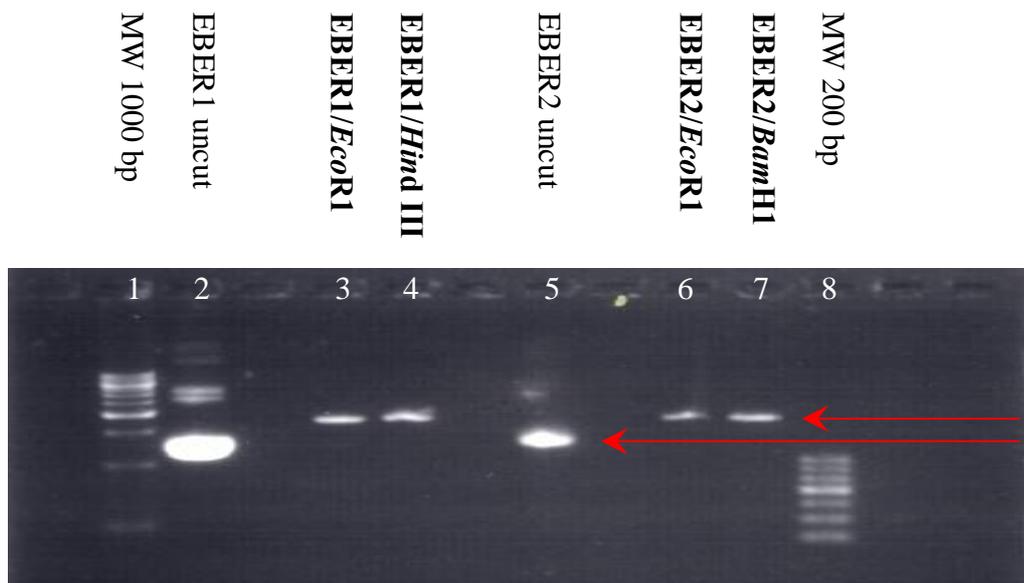


Abbildung 6 Gelelektrophorese zur Überprüfung der Linearisierung

### **Präzipitation der linearisierten Plasmide**

Ein klassisches Verfahren zur DNA-Extraktion stellt die kombinierte Anwendung von Salzfällung, Ethanol und Kälte dar. Dazu wurden die erfolgreich geschnittenen Vektor-DNA-Ansätze mit 3 M Natriumacetat (pH 4.2,  $\frac{1}{10}$  des Gesamtvolumens) und gekühltem (-20°C) 95% Ethanol (2,2x des resultierendes Gesamtvolumen) versetzt. Durch zusätzliche Kälteeinwirkung von -20°C über Nacht fällt die DNA aus. Zur weiteren Aufreinigung wurde das inhomogene Gemisch kühlzentrifugiert (14.000 rpm, 4°C). Die präzipitierte DNA sedimentiert als Pellet am Boden des Eppendorftubes. Nach vorsichtigem Abnehmen der DNA-freien Überstände erfolgte eine weitere Aufreinigung der DNA durch Waschen mit gekühltem 70%igen Ethanol (-20°C) und nachfolgender Zentrifugation (14.000 rpm, 4°C, 5 min). Das DNA-Sediment wurde nach Lufttrocknung in 10 µl DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert und lag in einer Endkonzentration von [1 µg/µl] zur weiteren Verwendung vor.

### **Markierung der RNA-Sonde durch in vitro-Transkription**

Zur Herstellung der RNA-Sonden wurden der SP6/T7-in vitro-Transkription Kit (Roche) und eine T3-RNA-Polymerase (Roche) zu einem T3/T7-Transkriptionssystem zusammengesetzt. Laut Hersteller ist die T3-RNA-Polymerase bereits als Erweiterung für den SP6/T7-Kit funktionsgetestet. Der RNase-Inhibitor und die Ribonukleotide wurden aus dem Transkriptionskit verwendet. Zur nicht radioaktiven Markierung der RNA-Sonden wurden Digoxigenin-markiertes UTP und unmarkiertes UTP im Verhältnis 1:2 den Polymerasen als Bausteine angeboten. Die entsprechenden Pipettierschemata zur Transkription sind im >Kurzschemata A des Anhangs< dargestellt. Die verwendete Restriktionsendonuklease und RNA-Polymerase determinieren, ob eine sense- oder antisense-Sonde geschrieben wird. Hierzu wurden pro Ansatz 2 µg der linearisierten EBER 1- bzw. EBER 2-DNA als Template eingesetzt. Bei 37°C wurde die Matrizen-DNA mit 2 µl der spezifischen RNA-Polymerase (T3- oder T7-) im empfohlenen Reaktionsmilieu aus 2µl T3- bzw. T7-10x Puffer, 8µl Ribonukleotid Gemisch von ATP, GTP CTP und 11-Dig-UTP/UTP im Verhältnis 1:1:1:1 und Ampuva-Wasser inkubiert. Um eine Integrität der produzierten Digoxigenin-markierten Sonde zu gewährleisten, wurde jeder Ansatz mit 1 µl RNase-Inhibitor versetzt. Komplementär zur DNA-Vorlage transkribiert die RNA-Polymerase in ihrer typischen

5'-3'Aktivität eine RNA-Kopie unter Verbrauch der angebotenen RNA-Synthesestufen. In Abhängigkeit vom Adenosin-Gehalt des templates wird mit 33%iger Wahrscheinlichkeit ein komplementärer, markierter Uracil-Baustein (Dig-11-UTP) in die Sonde integriert. Im Anschluss an die in vitro-Transkription wurden alle Ansätze bei 37°C mit 2 µl DNase (RNase-frei) für 15 min versetzt. Ziel der DNase-Behandlung ist das Hydrolysieren von Vektorsequenzen, die beim Sondeneinsatz durch ungewollte Anlagerung die spezifische Hybridisierung störend beeinflussen könnten. Unter optimalen Reaktionsbedingungen können aus 2 µg DNA bis zu 20 µg markierte RNA-Sonde generiert werden. Zum Abstoppen der in vitro-Transkription wurden die Enzyme durch Zugabe von 2 µl 0,2 mM EDTA (Ethylen-Diamin-Tetraacetat) inaktiviert und in einem zweiten Schritt durch Erhitzen auf 65°C für 10 min thermisch denaturiert.

#### **Bestimmung der RNA-Sondenkonzentration**

Zur visuellen Semiquantifizierung der Sondenkonzentration wurden je 2 µl des Transkriptansatzes im Vergleich zu einer definierten t-RNA-Konzentrationsreihe in einem 1x MOPS-Gel aufgetrennt. Hierzu wurden 1% Agarose (0,5g in 50ml Vol.) in 36ml aqua dest. gekocht und nach Abkühlung mit 5 ml 10x MOPS und 9 ml Formaldehyd versetzt. Anschließend sollte das Gel schnell gegossen werden bevor das Gemisch seine Fließeigenschaften verliert. Aufgrund des Einsatzes von 1µg/20µl-konzentrierter Vektor-DNA ist von einer geschätzten Transkript-RNA Erntekonzentration mit [10µg/20µl] auszugehen. Ausgehend von dieser erwarteten Sondenkonzentration sollte eine 2 µl Sondenprobe entsprechend 1 µg Transkript enthalten. Aus diesem Grunde wurde eine definierte t-RNA-Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen [1µg/2µl], [750ng/2µl], [500ng/2µl] und [100ng/2µl] zur semiquantitativen Abschätzung unserer Transkriptsonde hergestellt.

t-RNA 100 ng  
t-RNA 500 ng  
t-RNA 750 ng  
t-RNA 1 µg  
EBER 1 sense  
EBER 1 antisense  
EBER 2 sense  
EBER 2 antisense

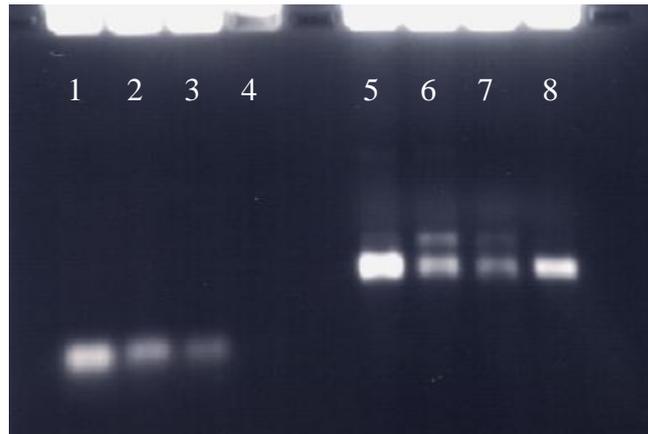


Abbildung 7

Gelelektrophorese zur semiquantitativen Abschätzung der EBER 1- bzw. EBER 2-Sondenkonzentration nach *in vitro*-Transkription im Vergleich zu t-RNA Proben definierter Konzentration

Jede Geltasche wurde neben den 2 µl RNA (entweder aus der Verdünnungsreihe oder aus den Sondenansätzen) mit weiteren 10 µl deionisiertem Formamid, 2 µl 10x MOPS, 3,5 µl 37% Formaldehyd, 1 µl Ethidiumbromid und 2 µl Gelladepuffer II beladen. Vor Instillation der 20 µl Volumina pro slot, wurden die Ansätze bei 65°C für 5 min thermisch denaturiert. Die identische Höhe der Sondenbanden [5] bis [8] unter der UV-Lampe unterstreicht, dass alle Sonden die gleiche Größe aufweisen und somit das EBER-Insert vollständig transkribiert wurde. Ein Vergleich der Ethidiumbromid Signalintensitäten der Standardkonzentrationsreihe [1] bis [4] mit der Signalintensität der Sondenproben [5] bis [8] ermöglichte eine semiquantitative, visuelle Abschätzung der jeweiligen Sondenkonzentration.

Tabelle 3 Übersicht der geschätzten Sondenkonzentrationen

EBER 1-sense	EBER 1-antisense	EBER 2-sense	EBER 2-antisense
3000 ng / 2 µl	1000 ng / 2 µl	400 ng / 2 µl	2000 ng / 2 µl

Zu beachten ist, dass lediglich die antisense-Sonde komplementär zur *in vivo* existenten EBER-Sequenz ist und somit nur mit der antisense-Sonde ein positiver EBV-Nachweis mittels *in situ*-Hybridisierung zu führen ist. Die sense-Sonde wurde zur Negativkontrolle eingesetzt.

### Durchführung der EBER-RNA-*in situ*-Hybridisierung

Die **EBV** encoded small **RNA** 1 und 2 (EBER 1 und 2) werden sowohl in der latenten als auch in der lytischen Zyklusphase der EBV-Infektion exprimiert und liegen nukleär vor. Die transkribierte EBER 1- und EBER 2-antisense-Sonde muss den Zellkern penetrieren und lagert sich *in situ*, spezifisch an die komplementären Zielsequenzen unter Ausbildung von stabilen Wasserstoffbrückenbindungen, an. Diese Doppelstrangbildung bezeichnet man allgemein als *Hybridisierung* und diesen speziellen Fall als RNA/RNA-Hybridisierung. Ein genaues Versuchsprotokoll mit der Abfolge der einzelnen Schritte und Einwirkzeiten ist im >Anhang Kurzschemata B< zu finden. Für die lichtmikroskopische Visualisierung der Digoxigenin-markierten Sonden wurden 3 Farbsysteme etabliert. Die Versuchsanleitungen B1 und B2 beschreiben die Detektion der RNA-Sonden unter Verwendung eines gegen Digoxigenin gerichteten, mit alkalischer Phosphatase-konjugierten Sekundärantikörpers (Roche), der im Fall B1 Neufuchsin und im Fall B2 NBT/BCIP als Farbedukte umsetzt. Im Fall B3 wurde ein mit Peroxidase-konjugierter, Anti-Digoxigenin gerichteter Sekundärantikörper (Roche) eingesetzt, der DAB als Substrat in der Visualisierungsreaktion verbraucht. Die Laborrichtlinien für RNase-freies Arbeiten sind bis zur Hybridisierung einzuhalten. Erst mit der RNA/RNA-Assoziation ist die Sonde vor einer Hydrolyse durch ubiquitäre RNase geschützt.

Zunächst erfolgte eine vollständige Entparaffinierung in Xylol (2x 5min, RT) und nachfolgend eine Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (2x 5min Ethanol absolut, 3 min 95% Ethanol, 3 min 80% Ethanol). Bevor die Schnitte in DEPC-H<sub>2</sub>O und anschließend in TrisHCl/EDTA-Puffer gewaschen wurden, wurden sie einer 20 min 0,2N HCl-Behandlung unterzogen. Um einerseits die Permeabilität der Sonden in das Gewebe bzw. in den Nukleus zu erhöhen sowie um andererseits Aldehydvernetzungen durch die Formalinfixierung zu lösen, erfolgte eine enzymatische Demaskierung durch eine Proteinase K-Behandlung [30µg/ml] in TrisHCl/EDTA bei RT. Da die Proteinase K erst nach 10 min ihr Aktivitätsmaximum erreicht, sollten die OT zeitversetzt eingestellt werden. Die gewählten Parameter (Enzymkonzentration, Einwirkzeit und Reaktionstemperatur) stellten das optimale Ergebnis unterschiedlicher Vorbehandlungstests dar. Nach dieser proteolytischen Behandlung der Gewebe müssen die OT mehrmals in frischem 1x PBS gewaschen werden, um ein Nachwirken der

Proteinase zu verhindern. Zudem wurde die Andareaktion durch 0,2% Glycin in PBS gestoppt. Anschließend erfolgte für 20 min bei RT eine Postfixierung in 4% Paraformaldehyd mit nachfolgendem 1x PBS Waschschrift. Zur Acetylierung basischer Gruppen, die später Sonde unspezifisch über elektrostatische Anziehung binden können, wurden die Gewebeschnitte in 0,25% Acetic Anhydrid in 0,1M Triethanolamin/PBS inkubiert. Nach erneutem Waschen in 1x PBS und Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (80% Ethanol, 95% Ethanol) wurden die OT, um eine Verdünnung der Sonde beim Auftragen des Hybridmixes zu verhindern, luftgetrocknet.

Jeder Objektträger wurde mit 100 µl eines Hybridmix-Sondengemisches eingedeckt und bei 50°C in einer feuchten Kammer (6x SSC) über Nacht inkubiert. Für diesen Hybridisierungsschritt wurden Hybridmix und Sondengemisch getrennt voneinander hergestellt. Der Hybridmix für 500 µl Hybridmixsondengemisch enthielt 250 µl 100% deionisiertes Formamid, 125 µl Dextransulfat, 62,5 µl 20 SSC, 12,5 µl total yeast RNA [5 µg/µl], 12,5 µl t-RNA [10 µg/µl] und 6,25 µl Hering-Sperma DNA [10 µg/µl]. Formamid stört die Ausbildungen von Wasserstoffbrückenbindungen. Dieser destabilisierende Effekt von Formamid senkt die Schmelztemperatur  $T_M$ , wobei hierbei DNA/DNA-Hybride stärker beeinflusst werden als RNA/RNA-Hybride. Dadurch kann durch den Einsatz von Formamid die Bildung von RNA/RNA-Hybriden gegenüber DNA/DNA-Hybriden begünstigt werden. Dextransulfat ist ein inertes Polymer ohne Einfluss auf die Schmelztemperatur, reduziert jedoch das für die Assoziation bzw. Dissoziation zur Verfügung stehende Volumen und erhöht die Hybridisierungsrate um den Faktor 100. Ein niedriger Salzgehalt im Hybridmix erhöht die Stringenz, das heißt die Sonde kann nur bei großer Homologie zur Zielsequenz stabile Hybride ausbilden. Unterschiedliche DNA- bzw. RNA-Moleküle werden im Überschuss zugegeben; sie sollen sich kompetitiv an vorhandener DNA bzw. RNA unspezifisch anlagern und somit unspezifische Bindungen der markierten Sonde reduzieren. Um die eingesetzten Nukleinsäuren in Einzelstränge zu spalten bzw. um ihre Sekundärstruktur aufzuheben, wurde der Hybridmix im Heizblock bei 105°C für 10 min hitzebehandelt und nach dem Abkühlen auf RT mit 5 µl 1M DTT versetzt. Zeitgleich wurden als Sondengemisch je 40 µg antisense-EBER 1- bzw. EBER 2-Sonde in 5 µl DEPC-H<sub>2</sub>O vorgelegt und im Wasserbad bei 80°C erhitzt. Obwohl eine Denaturierung bei einzelsträngiger RNA nicht erforderlich wäre, führt die Hitzebehandlung zur Aufhebung der Sekundärstruktur der

RNA und erhöht den Anteil der Fragmente, die zur Hybridisierung direkt zugänglich sind. Die eingesetzte Sondenmenge wurde im Verlauf der Versuchsreihe schrittweise erhöht, da die RNA-Sonde durch wiederholtes Auftauen degradierte. Nach jeweiliger Einzelvorbehandlung wurden Sondengemisch und Hybridmix gemischt, je 100µl pro OT aufgetragen und mit einem RNase-freien Deckglas bedeckt.

Am nächsten Tag wurden die Deckgläser in 4x SSC bei RT abgelöst und die OT für 10 min in 1x Net-Puffer bei 37°C eingestellt. Die anschließende RNase-Behandlung [20µg/ml] bei 37°C sollte nicht-spezifisch assoziierte bzw. freie RNA-Moleküle verdauen und den Hintergrund auf ein Minimum reduzieren. Da eine Hybridisierung bei optimaler Temperatur (nahe der Schmelztemperatur  $T_M$ ) aufgrund von zu erwartenden Gewebeschäden nicht möglich ist, sondern bei  $T_M-25^\circ\text{C}$  erfolgt, bestimmen Stringenzwaschungen post Hybridisierung das Ausmaß von unspezifischen, sogenannten miss-matched Hybriden. Dazu werden die OT bei 45°C in 2x SSC für 1 Stunde gewaschen. Ein niedriger Salzgehalt und eine hohe Temperatur stellen hohe Stringenzbedingungen dar. Spezifische Paarungen sind stabiler, halten den hohen Stringenzbedingungen eher als nicht-komplementäre bzw. unspezifische Anlagerungen stand. Diese stringenten Waschungen induzieren eine erneute Dissoziation der Hybride mit geringer Homologie und erhöhen den Grad spezifischer Bindungen. Anschließend wurden die OT nach kurzer Waschung in Dig 1-Puffer mit jeweils 100 µl 1%-Blockungsreagenz bedeckt und für 30 min bei RT inkubiert. Nachdem unspezifische Bindungsstellen durch diese Vorbehandlung abgeblockt wurden, erfolgte die Detektion der Digoxigenin-markierten Sonden mit einem alkalische Phosphatase (AP)-gekoppelten Digoxigenin-Antikörper in einer Verdünnung von [1:300] in Blockungsreagenz bei RT für 30 min (im Fall B1 und B2). Im Fall B3 erfolgte die Detektion der Sonde mit einem Peroxidase (HRP)-konjugierten Digoxigenin-Antikörper in einer Verdünnung von [1:100] in Blockungsreagenz. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass endogene Peroxidase, d.h. gewebeständige Peroxidase, zuvor blockiert werden muss. Zur Eliminierung endogener Peroxidase erfolgte eine Inkubation der Präparate mit 3% Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) in DEPC- $\text{H}_2\text{O}$ . Durch Zusatz eines Chromogens als Substrat für Reaktionen mit AP (Neufuchsin (B1), NBT/BCIP (B2)) bzw. für Reaktionen mit HRP (DAB (B3)) wurde der Hybridisierungserfolg visualisiert und mittels Mikroskop (Zeiss) in Hellfeld detektiert. Bei gewünschter Signalintensität wurde

die Farbreaktion durch Waschschrirte in Dig 1 und aqua dest. gestoppt und die Präparate nachfolgend mit wässrigem Eindeckmedium konserviert.

#### **4.6.2 CMV-DNA-*in situ*-Hybridisierung**

Zur CMV-DNA-*in situ*-Hybridisierung wurde eine kommerziell erworbene, Biotin-markierte CMV-DNA-Sonde der Firma Enzo verwendet. Der Vorteil einer DNA-Sonde liegt in ihrer, im Vergleich zur RNA-Sonde, höheren Umweltstabilität, d.h. beim Umgang mit der Sonde ist die Gefahr der Degradation durch hydrolytische Enzyme weniger kritisch. Nachteil einer DNA-Doppelstrang-Sonde liegt in der notwendigen Denaturierung, d.h. in Aufspaltung in Einzelstränge, unmittelbar vor der Hybridisierung. Der Doppelstrangcharakter birgt weiterhin die Gefahr der reinen Reassoziatiön der Sondeneinzelstränge, die damit einer Hybridisierung nicht zur Verfügung stehen. Weiterhin sind gebildete DNA/DNA-Hybride weniger stabil als RNA-Hybride.

#### **Durchführung der CMV-DNA-*in situ*-Hybridisierung mit APAAP Verstärkungssystem**

Durch direkten Nachweis der CMV-DNA auf Zellebene mittels *in situ*-Hybridisierung lässt sich der Beweis einer lytischen oder einer latenten CMV-Virusinfektion führen. Das >Kurzschema C im Anhang< beinhaltet ein genaues Versuchsprotokoll mit Abfolge der einzelnen Schritte und Einwirkzeiten. Zur thermisch-chemischen DNA-Denaturierung der CMV-Sonde und der viralen Ziel-DNA wurden sowohl ein Heizplatten Verfahren (C1) als auch eine Mikrowellenbehandlung (C2) etabliert.

Nach Entparaffinierung in Xylol (2x 10 min, RT) und anschließender Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe (2x Isopropanol, 90% Ethanol, 70% Ethanol, je 5min bei RT) wurden die Gewebeschnitte einer proteolytischen Vorbehandlung mit 0,1 % Pronase in PBS-Puffer (5-6 min, bei RT) zugeführt. Vor Auftragen des Sonden-Hybridisierungsgemisches erfolgten ausgedehnte Waschschrirte in 1x PBS. Insgesamt wurden pro OT 75 ng der CMV-spezifischen Sonde mit 10 µg Hering-Sperma-DNA in 20 µl Hybridmix (50% Formamid, 2x SSC, 10% Dextransulfat) hybridisiert. Hering-Sperma-DNA, in seiner Funktion als carrier-DNA, wurde im Vergleich zur Sonde im Überschuss eingesetzt, um unspezifische DNA-Anlagerungsstellen abzublocken. Die destabilisierende Wirkung des Formamids begünstigt die Aufspaltung der

Doppelstränge und erhöht folglich die Zahl der Fragmente, die an der Hybridisierung teilnehmen können. Der niedrige Salzgehalt des Hybridmix erschwert eine stabile Assoziation zwischen nicht rein komplementären Paarungen und erhöht somit die Stringenz der Hybridisierung. Die Volumenreduktion durch die Polymerverbindung Dextransulfat führt zu einer konsekutiven Erhöhung der Sondenkonzentration und Hybridisierungsrate. Zusammenfassend erzeugt der Hybridmix neben der gewählten Temperatur günstige Hybridisierungsbedingungen bei möglichst hoher Spezifität. Die thermische Komponente der simultanen Denaturierung von Sonde und Target erfolgte entweder durch Heizplattenerwärmung bei 80°C für 10 min oder durch eine Mikrowellenbehandlung (450 W 2 min + 150 W 6 min). Anschließend wurden die Objektträger in einer feuchten Kammer zur Hybridisierung bei 42°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte nach Auswaschen nicht-gebundener Sonde in 1x PBS, die Detektion der hybridisierten Sonde durch einen gegen das Hapten Biotin gerichteten, monoklonalen Maus-Primärantikörper ([1:100] in 1% BSA/PBS) für 1h bei RT. Der Primärantikörper wurde durch eine Antikörperkette gemäß dem APAAP-Protokoll (DAKO) (siehe Immunhistochemie) dargestellt und durch eine AP-vermittelte Neufuchsin- oder NBT/BCIP-Farbreaktion visualisiert. Der sekundäre Brückenantikörper ([1:30] in 20% Humanserum/PBS) und der APAAP-Komplex ([1:50] in 1x PBS) inkubieren jeweils 30 min bei RT. Nach jeder Antikörperinkubation erfolgten Waschungen in 1x PBS. Bei ausreichender Signalintensität wird der Chromogensatz gestoppt und nach Waschung in aqua dest. die Präparate mit aqua tex. eingedeckt. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte in mikroskopischer Hellfelddetektion.

#### **Durchführung der CMV-DNA-*in situ*-Hybridisierung mit Tyramin-Verstärkungssystem**

Als Modifikation zum Standard-Protokoll wurde statt der APAAP-Detektion ein Tyramin-verstärktes Detektionssystem (>Kurzschema D< im Anhang) etabliert. Verwendet wurde ein kommerziell erworbener Tyraminverstärkungskit (TSA<sup>TM</sup> Biotin System, NEN Life Science Products). Das Prinzip der Tyraminverstärkung entstammt der Immunhistochemie und wird unter 4.6 erläutert. Die Gewebebehandlung und die

Hybridisierung (TAG I) erfolgte identisch zum Standard-Protokoll, lediglich eine zusätzliche 3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Behandlung nach dem Entparaffinieren bzw. Rehydrieren war erforderlich. Da die Aktivierung und die kovalenten Bindungen der biotinylierten Tyramide durch Meerrettich-Peroxidase (HRP) katalysiert werden, sollte endogene Peroxidase mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  geblockt werden, um Hintergrund zu minimieren. Nach Blockung im TNB-Blockungspuffer (30 min bei RT) wurde über einen Inkubationsschritt mit Streptavidin/HRP ([1:100] in 1% BSA/PBS, DAKO) das erforderliche HRP in das Detektionsprotokoll integriert. Die Anlagerung erfolgt aufgrund der Affinität von Streptavidin zum Sondenhapten Biotin. Anschließend erfolgte durch eine Biotin-konjugierte Tyraminbehandlung ([1:50] Arbeitsverdünnung, Dauer 10 min) die amplifizierende Inkorporierung zahlreicher Biotin-Bindungsstellen. Diese Bindungsplätze wurden durch erneuten Einsatz von Streptavidin/HRP unter Streptavidin/Biotin (AB) Komplexbildung abgesättigt. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurde ausgiebig mit 1x PBS gewaschen. Die Visualisierung erfolgte durch die Verwendung einer geeigneten Enzym (HRP)- Chromogen (DAB) Kombination. Nach Eindecken mittels aqua tex. wurden die Färbungen im Hellfeld ausgewertet.

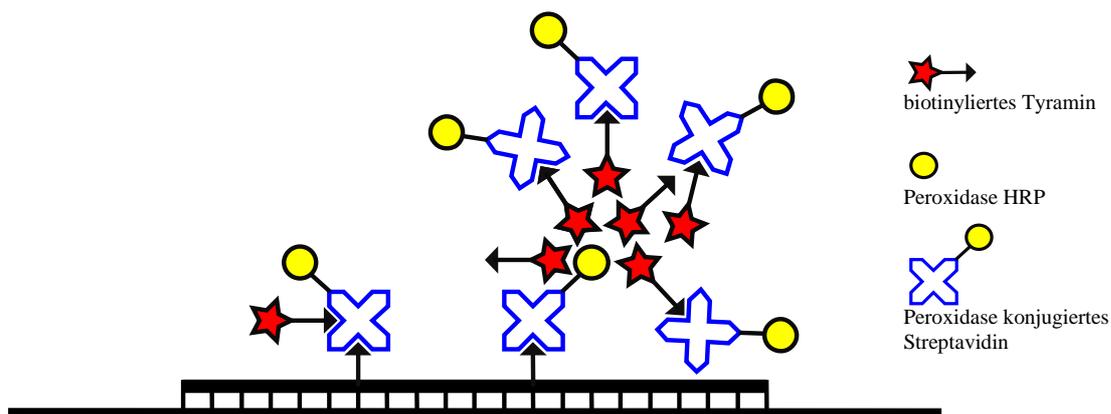


Abbildung 8 schematische Darstellung der Detektion der biotinylierten CMV-DNA-Sonde post in situ-Hybridisierung über HRP-konjugiertes Streptavidin und additiver Tyramin-Verstärkung

## 4.7 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC) ist eine Technik zur Detektion von Proteinen unter Ausnutzung der Spezifität von Immunglobulinen. Hierbei wird das Antigen spezifisch über die  $F_{ab}$ -Fragmente eines Primärantikörpers in situ gebunden. Zur Visualisierung des Antikörper-markierten Antigens lassen sich prinzipiell Fluoreszenz- und Hellfelddetektionsverfahren unterscheiden. Aufgrund der besseren Beurteilbarkeit des morphologischen Kontextes kommt in der Arbeit ausschließlich die Hellfeldmethode zum Einsatz. Hierbei katalysieren im Detektionssystem integrierte Markerenzyme (alkalische Phosphatase oder Peroxidase) eine Chromogensatzreaktion und erzeugen einen Farbniederschlag um den Antigenlocus. Weiterhin wird zwischen direkten und indirekten Nachweisverfahren differenziert. Definitionsgemäß erfüllen bei direkten Nachweisverfahren die Primärantikörper sowohl die Antigenerkennungs- als auch die Visualisierungsfunktion aufgrund einer spezifischen Markierung. Die Konjugation mit einem Markermolekül kann jedoch die Antigenbindung aufgrund sterischer Behinderung erschweren. Aus diesem Grund kommen in der vorgestellten Arbeit zwei indirekte Nachweisverfahren zur Anwendung. Bei diesen wird das Protein durch eine Antikörperkette entweder aus Primär- und markiertem Sekundärantikörper (ABC) oder durch zusätzlichen Einsatz eines Brückenantikörpers und enzym-tragendem Tertiärantikörperkomplex (APAAP) visualisiert. Ein zusätzlicher Vorteil der indirekten Nachweisverfahren liegt in einer erhöhten Sensitivität aufgrund einer Signalverstärkung.

Bei allen immunhistochemischen Arbeiten am Paraffinschnitt ist eine Vorbehandlung der Objektträger unerlässlich. Es erfolgte eine Entparaffinierung in Xylol mit anschließender Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe. Danach wurden die Objektträger zuerst in aqua dest. und anschließend in einem Puffer gespült. Bei Inkorporation von Peroxidase als Markerenzym musste eine Blockung der endogenen Peroxidase durch eine  $H_2O_2$ -Behandlung der OT durchgeführt werden. Um eine bessere Antikörperpenetration zu ermöglichen bzw. um die spezifischen Epitope zu demaskieren kann eine proteolytische Behandlung am formalinfixierten Paraffinschnitt erforderlich sein. Alternativ kann eine Demaskierung der Antigene auch durch eine Hitzebehandlung erfolgen. Eine Pronase-Inkubation (0,1% - 1% Pronase in 1x PBS) oder Hitzebehandlung (Kochen durch Mikrowellenbehandlung bei 700W in

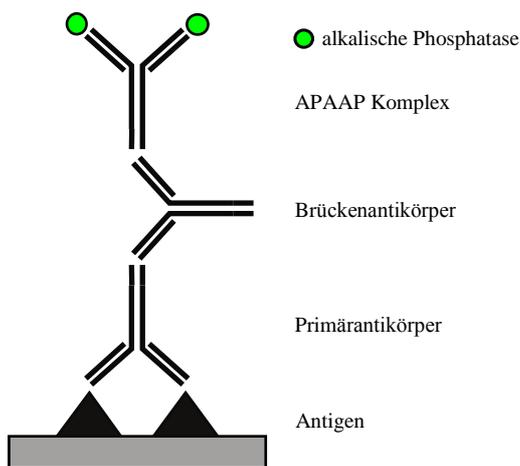
Citratpuffer) wurde in Testreihen für das jeweilige Protokoll optimiert und ist im Immunhistochemie-Kurzschema E bis H (Anhang) aufgeführt.

### **APAAP-Verfahren (alkalische Phosphatase anti alkalische Phosphatase)**

#### Parvovirus B19-VP1- und -VP2-IHC in APAAP-Visualisierungstechnik

Das APAAP-Verfahren stellt eine klassische Visualisierungstechnik der Immunhistochemie dar, die zur Signalerzeugung in eine durch alkalische Phosphatase katalysierte Farbreaktion mündet. In der vorliegenden Arbeit wurde die APAAP-Methode zur lichtmikroskopischen Detektion einer Parvovirus B19-Infektion etabliert (>Kurzschema E<, siehe Anhang). Zur Antigen-spezifischen Erkennung wurde ein monoklonaler Mausantikörper verwendet, der gegen das Virus-Kapsidprotein VP1 und VP2 gerichtet ist. Der Antikörper erkennt beide Strukturproteine, da die Gene für VP1 und VP2 überlappen, wobei der Leserahmen für VP2 vollkommen im Raster von VP1 integriert liegt. Dieser nicht-kommerziell erhältliche Primärantikörper wurde freundlicherweise von Dade Behring bereitgestellt. Entsprechend der Firmenempfehlung erfolgte eine Inkubation der Gewebeschnitte in einer Antikörperverdünnung von [1:100] in 1% BSA/PBS für eine Stunde bei RT. Allgemein wird nach erfolgreicher Bindung eine Detektion des Primärantikörpers über eine Zwei-Schritt-Antikörperkette durchgeführt. Der tertiäre Maus-APAAP-Immunkomplex wird in dieser Kette über einen mausspezifischen Kaninchen-Brückenantikörper an den Primärantikörper gebunden. Hierzu erfolgte im ersten Schritt eine Inkubation mit einem universellen gegen Maus gerichteten Kaninchenantikörper ([1:30] in 20% Humanserum/PBS) und im zweiten Kettenschritt das Aufbringen des Maus-APAAP-Komplexes nach Gebrauchsanweisung ([1:50] in 1x PBS). Zur Kettenbildung wurden die Immunglobulin-Lösungen jeweils 30 min aufgetragen. Die Zugabe von Rinderserumalbumin (BSA) oder Humanserum zum Antikörper-Verdünnungspuffer zielt auf eine Hintergrundreduktion ab. Elektrostatische Ladungen der Proteine und hydrophobe Antikörper-Bindungsstellen im Untersuchungsgut werden unspezifisch abgeblockt. Zwischen den drei Antikörperschritten wurden die Objektträger in 1x PBS gespült, um überschüssige oder unspezifisch-gebundene Antikörper auszuwaschen. Der APAAP-Immunkomplex besteht aus einem monoklonalen Antikörper gegen alkalische Phosphatase und muss mit der Tiergattung des Primärantikörpers übereinstimmen. Die

variablen Bindungsstellen des APAAP-Immunglobulins sind mit AP abgesättigt, welches die angestrebte Farbreaktion katalysiert. Als Chromogen wurde das NBT/BCIP Redoxsystem eingesetzt. Bei ausreichender Signalintensität wurde die Reaktion durch Abspülen der Farbreaenzien in aqua dest. gestoppt und die Gewebeschnitte mit aqua tex. eingedeckt.



Einen Verstärkungseffekt erzielt diese Komplexnachweismethode erstens durch ein günstiges Enzym zu Primärantikörper-Verhältnis und zweitens durch eine mögliche Wiederholung der Brückenantikörper- und APAAP Anlagerung.

Abbildung 9 Schema der APAAP - Methode  
(Abb. modifiziert übernommen aus  
„Praxis der Immunhistochemie“,  
Noll et al., Urban & Fischer)

### Doppelmarkierung: Parvovirus B19-IHC mit nachfolgender CD3- bzw. CD20-IHC

Zur Typisierung der Parvovirus B19-positiven Zellen wurden zwei immunhistochemische Färbungen zu einer Doppelmarkierung kombiniert. Die Doppelmarkierung bietet sich aufgrund einer räumlichen Trennung der Antigene in situ an. Die CD-Moleküle besetzen als Epitope die Zellmembran und die Virusproteine liegen cytoplasmatisch vor. Die Parvovirus B19-Antigen-Detektion erfolgte nach dem etablierten Protokoll (>Kurzschemata E<). In einer zweiten immunhistochemischen Nachweisreaktion erfolgte eine Zellcharakterisierung durch Verwendung eines B-Zell-spezifischen CD20-Antikörpers (DAKO, [1:30]) oder eines T-Zell-spezifischen CD3-Antikörpers (Novocastra, [1:100]). Da beide Primärantikörper (Parvovirus B19 VP1/VP2-Antikörper und CD-Epitop-Antikörper) monoklonale Maus-Immunglobuline

waren, mussten die Inkubationen und Entwicklungen sequentiell erfolgen. Durch zeitliche Trennung der IHC-Färbungen konnten Kreuzreaktionen bei der Antikörperkettenbildung verhindert werden. Zur Detektion und Farbentwicklung der CD-Moleküle wurde ein Färbeautomat (NexES Programm, Ventana) eingesetzt. Um Kreuzreaktivität zu verhindern, wurde beim Automaten ein Peroxidase-mediertes Entwicklungssystem gewählt. Zur Signaldifferenzierung wurde als Kontrastfarbe zur NBT/BCIP-Virusmarkierung AEC als Chromogen eingesetzt.

Tabelle 4 Kombinationen der Doppelmarkierung

Kombination	1. ICH			2. IHC	
I	Parvovirus B19 VP1 / VP2 IHC	APAAP + NBT/BCIP	+	CD 3 IHC	Peroxidase + AEC
II	Parvovirus B19 VP1 / VP2 ICH	APAAP + NBT/BCIP	+	CD 20 IHC	Peroxidase + AEC

#### **ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex)**

Analyse auf weitere Virusproteine (**EBV-LMP, EBV-ZEBRA, EBNA und CMV-EA**) zur Charakterisierung hinsichtlich der Aktivität der viralen Infektion:

Ein weiteres indirektes Komplexnachweisverfahren stellt die ABC-Methode dar. Die Visualisierung wird hierbei über das Markerenzym Peroxidase vermittelt. Eingesetzt wird die ABC-Methode, wie alle indirekten Nachweisverfahren, zur universellen Detektion einer spezifischen Antigen-Primärantikörperbindung. Die Grundlage der ABC-Technik beruht auf der starken Affinität von Avidin bzw. Streptavidin zu Biotin. Zunächst wird das Hapten Biotin in die Nachweiskette eingebracht, welches in einem zweiten Schritt mit Avidin-Biotin Komplexen abgesättigt wird. In idealen AB-Komplexen besetzt biotinylierte Peroxidase zwei der vier Biotin-Bindungsstellen des (Strept-)Avidin-Moleküls. Über die freien Bindungsstellen erfolgt die Vernetzung zur Nachweiskette oder Quervernetzung zu weiteren AB-Komplexen.

Da in der Immunhistochemie lediglich die Primärantikörper die Spezifität determinieren, wurde in der vorliegenden Arbeit die ABC-Methode zur universellen Detektion speziesgleicher, aber Antigen-differenten Primärantikörper eingesetzt. Allein durch Variation der monoklonalen Maus-Primärantikörper bei sonst konstantem

Protokoll erfolgten Untersuchungen auf verschiedene Virusproteine, die weiteren Aufschluss über Präsenz, Latenz oder Replikation der untersuchten Viren zuließen (>Kurzschema F und G<, Anhang). Nach oben beschriebener Vorbehandlung der Gewebeschnitte erfolgte eine Inkubation mit den Primärantikörpern in optimaler Gebrauchskonzentration für eine Stunde bei RT oder bei 37°C. Zur Analyse einer replikativen CMV-Infektion wurde ein gegen CMV-EA (Early Antigen)-gerichteter Antikörper eingesetzt. Bei Nachweis einer EBV-Infektion auf RNA-Ebene (EBER-ISH) wurde mittels IHC eine Infektion auf Proteinebene bestätigt. Zur Differenzierung zwischen latentem und lytischem Zellzyklus wurde ein zu LMP (EBV latent membrane protein)- bzw. ein zu Zebra-Protein (= BZLF1) reaktiver Antikörper eingesetzt.

Tabelle 5 eingesetzte optimale Primärantikörperverdünnungen für IHC

	Antigen	Primärantikörper	Verdünnung in 1 x PBS	Kurzschema
I	CMV EA	monoklonaler Mausantikörper (DAKO)	[1:50]	G1
II	EBV LMP EA	monoklonaler Mausantikörper (DAKO)	[1:20]	G2
III	EBV Zebra-Protein	monoklonaler Mausantikörper (DAKO)	[1:400]	H

Vor dem Aufbringen des spezifischen Primärantikörpers erfolgte zur Reduktion unspezifischer Bindungen eine Blockung mit 20% Kaninchennormalserum in PBS. Generell richtet sich die Auswahl der richtigen Tierspezies zur Normalserumblockung nach der Tierspezies des verwendeten Sekundärantikörpers. Um den Blockungseffekt zu erhalten, darf man das Serum nicht abspülen sondern lediglich ablaufen lassen.

Über eine 30 min Inkubation bei RT mit einem biotinylierten Anti-Maus-Sekundärantikörper ([1:200] in 1x PBS) wurden die gebundenen Primärantikörper mit Biotin opsoniert. Anschließend erfolgte eine Absättigung dieser Biotinmarkierung mit HRP-konjugierten AB-Komplexen für 30 min bei RT (DAKO). Zwischen den einzelnen Antikörper- bzw. Detektionsschritten erfolgten frequente Waschungen in 1x PBS. Durch das Einbringen von HRP als Markerenzym konnten die Antigenloci lichtmikroskopisch durch eine katalysierte Farbreaktion mit AEC visualisiert werden (F1, F2). Nach ausreichender Signalentwicklung erfolgte ein Abstoppen der Reaktion in

1x PBS und aqua dest. Zur Kontrastierung wurde mit Hämalaun kerngefärbt, in Leitungswasser gebläut und in erwärmter Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.

Die massive Enzymanreicherung um die Nachweiskette über HRP-gesättigte AB-Komplexe und weitere AB-Quervernetzungen beinhaltet das Verstärkungsprinzip der ABC-Methode.

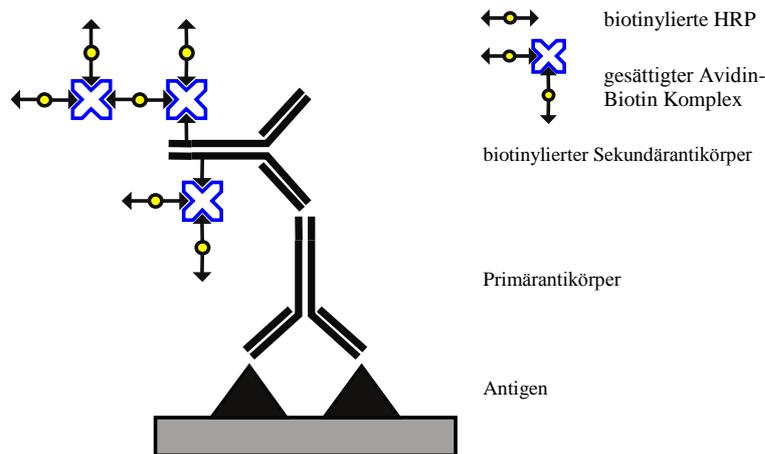


Abbildung 10 schematische Darstellung der ABC-Methode  
(Abb. modifiziert übernommen aus „Praxis der Immunhistochemie“, Noll et al., Urban & Fischer)

#### Analyse auf Zebra-Protein mittels IHC und Tyramin-verstärkter ABC-Methode

Mit dem Ziel einer weiteren Signalintensivierung wurde im Rahmen des Zebra-Protein Nachweises (Kurzschema G) zur ABC-Detektion eine Tyramin-Verstärkung addiert. Statt der unmittelbaren Visualisierungsreaktion nach Einbringen der AB-Komplexe wurden die Objektträger zunächst für 10 min bei RT mit biotinyliertem Tyramin inkubiert und anschließend erneut mit AB-Komplexen abgesättigt (20 min, RT). Anschließend erfolgte eine Farbentwicklung über eine DAB-Peroxidase-Farbreaktion.

### Tyraminverstärkte Immunhistochemie

Die Tyramin-verstärkte Immunhistochemie stellt eine Sonderform der ABC-Methode dar. Nach der klassischen Anlagerung der Peroxidase-konjugierten AB-Komplexe erfolgt in einem weiteren Inkubationsschritt die Bindung mit biotinyliertem Tyramin. Die eingebrachte Peroxidase des ABC-Protokolls katalysiert die Anlagerung und die kovalente Bindung des markierten Tyramids. Durch die Ablagerung von biotinyliertem Tyramin um den Antigenlocus werden neue Biotinbindungsstellen frei, die in einem erneuten Inkubationsschritt mit Peroxidase-markierten AB-Komplexen durch Komplexanlagerungen besetzt werden. Konsekutiv endet diese schrittweise Komplexanhäufung in einer erheblichen Vermehrung von gebundener Peroxidase um den Antigenlocus. Über eine klassische Peroxidase-medierte Chromogensatzreaktion (z.B. DAB) kann das Antigen visualisiert werden.

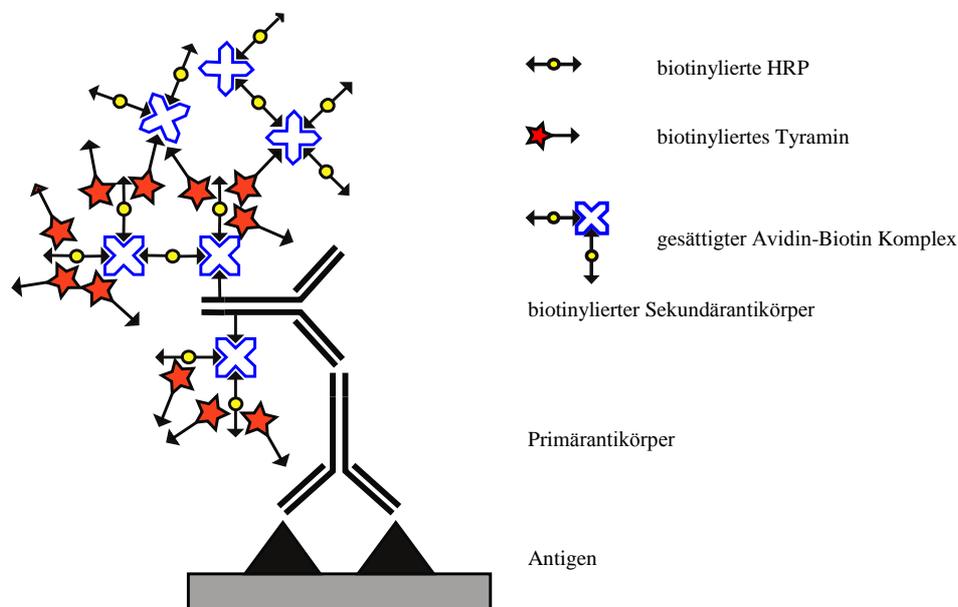


Abbildung 11 schematische Darstellung der tyramin-verstärkten ABC Methode

Detektion auf EBNA (Epstein-Barr nuclear antigen) mittels IHC und Tyramin-verstärkter ABC-Methode

Sechs Fälle, die auf Proteinebene (LMP-Untersuchung) und/oder auf RNA-Ebene (EBER 1/2-ISH-Untersuchung) eine ausgeprägte EBV-Infektion zeigten, wurden selektiv mittels Immunhistochemie zusätzlich auf eine EBNA 1-Expression untersucht.

Der nicht kommerziell erhältliche, spezifische EBNA-Rattenprimärantikörper wurde freundlicherweise von Prof. Friedrich Grässer (Institut für Virologie, Universität des Saarlandes, Homburg) bereitgestellt. Das empfohlene Protokoll (>Kurzschemata H<, Anhang) beinhaltet eine Tyramin-verstärkte AB-Komplexdetektion mit abschließender Peroxidase-vermittelter Visualisierungsreaktion unter Zusatz von DAB als Farbsubstrat. Der Versuch erfolgte identisch zu dem oben beschriebenen Standardprotokoll, lediglich eine Demaskierung wurde durch Kochen in Citratpuffer erzeugt. Nach Inkubation mit dem Primärantikörper ([1:20] in 1x BSA/PBS, 1 h bei 37°C) wurde HRP direkt durch Konjugation an den Sekundärantikörper in die Detektionskette eingebracht. Verwendet wurde ein gegen Ratte gerichteter Ziegenantikörper ([1:150] in 1x BSA/PBS, 30min, RT), dessen Enzymmarker Peroxidase die biotinylierte Tyramin-Bindung katalysierte. Nach Absättigung der Biotinhaptene mit AB-Komplexen wurde die Detektion mit einer DAB-Farbentwicklung visualisiert.

#### **4.8 Chromogenreaktionen**

Die Beurteilung des morphologischen Kontextes bei positivem Virusnachweis beinhaltet einen zusätzlichen Aspekt der bearbeiteten Fragestellung. Um Aussagen über die Wirtszellen und ihre Lokalisation im Gewebe treffen zu können, ist die Hellfelddetektion prädestiniert. Aus diesem Grunde mündeten die Detektionssysteme im Rahmen der ISH und IHC in Enzym-medierten Farbreaktionen. Die integrierten Markerenzyme katalysieren eine Chromogenumsatzreaktion, deren Endprodukt einen Farbniederschlag am Antigen- bzw. Sondenlocus erzeugt. Folgende Tabelle zeigt eine Übersicht der eingesetzten Kombinationen aus Markerenzym und Chromogensubstrat. Die Chromogenlösungen wurden nach Herstellerempfehlungen hergestellt und die Signalentwicklung stichprobenartig bis zum Reaktionsabbruch im Hellfeld verfolgt.

Tabelle 6 *eingesetzte Chromogen Enzym Kombinationen für IHC und ISH*

	<b>Kombination</b>			
	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
Markerenzym	Peroxidase	Peroxidase	Alkalische Phosphatase	Alkalische Phosphatase
Chromogen	<b>HRP</b> + <b>DAB</b>  (3,3- Diamino- benzidin)	<b>HRP</b> + <b>AEC</b>  (3-Amino-9- ethylcarbazol)	<b>AP</b> + <b>BCIP/NPT</b>  (5-Brom-4-Chlor- 3-Indolylphosphat /Nitroblautetra- zolumchlorid)	<b>AP</b> + <b>Neufuchsin</b>
Farbe des Produktes	braun	rotbraun	dunkelblau/ violett	rot
Hersteller	DAKO	DAKO	VECTOR	DAKO



## 5 Ergebnisse

### 5.1 Parvovirus B19-Untersuchungen

#### 5.1.1 Nachweis einer synovialen Parvovirus B19-Infektion (IHC)

Der Nachweis einer Parvovirus B19 Infektion erfolgte über die immunhistochemische Detektion der beiden Hauptstrukturproteine VP1 und VP2 an Synovia-Paraffinschnitten. VP1 und VP2 sind Spleißvarianten eines gemeinsamen Haupttranskriptes, wobei die kleinere VP2-Sequenz vollkommen in der VP1-Sequenz integriert liegt. Parvovirus B19 ist nicht zu einer latenten Infektion fähig, d.h. nur durch ständige Replikation ist das Virus in der Lage in der Wirtszelle zu persistieren. Der Nachweis der Kapsidproteine indiziert somit eine replikative Infektion der betroffenen Zellen.

Unter rein qualitativer Betrachtungsweise zeigten 65% (n=41) der untersuchten Synovialproben (n=63) eine replizierende Parvovirus B19 Infektion. Bei Aufschlüsselung der positiven Fälle nach der klinischen Diagnose ergab sich folgende Verteilung: In 89,7% (n=26) der RA-Fälle, 66% (n=4) der PSA-Fälle, 38,5% (n=10) der reaktiven Arthritiden/Synovitiden und einer der beiden unveränderten, klinisch normalen Synovialproben ließ sich Parvovirus B19-VP1/2-Protein nachweisen.

*Tabelle 7 Parvovirus B19-positive Synovialproben unterschiedlicher Arthritis-Entitäten*

Klinische Diagnose	RA	PSA	rA/S	nS	
Parvovirus B19-positive Fälle	26	4	10	1	$\Sigma$ 41
Gesamtzahl der Fälle	29	6	26	2	$\Sigma$ 63
Positive Fälle / Gesamtzahl	89,7%	66%	38,5%	---	65%

*Verteilung entsprechend der VP1- und VP2-IHC Analyse, unterschiedliche Arthritis-Entitäten: Rheumatoide Arthritis (RA), Psoriasis Arthritis (PSA), reaktive Arthritis/Synovitis (rA/S), normale Synovia (nS)*

Bei einer detaillierten quantitativen Betrachtung unterschieden sich die viruspositiven Fälle eindrücklich bezüglich der Anzahl positiver Zellen und ihrer Verteilung im histologischen Präparat. Um dem unterschiedlichen Ausmaß der Infektion gerecht zu werden, erfolgte eine semiquantitative Klassifikation in folgende 3 Gruppen.

Tabelle 8 Übersicht über die 3 Klassen, die das unterschiedliche Ausmaß der Virusinfektion repräsentieren

Ausmaß der Infektion		
Gruppe I	+	singuläre virus-positive Zellen
Gruppe II	++	einige virus-positive Zellen
Gruppe III	+++	zahlreiche virus-positive Zellen

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen Parvovirus B19-positive Fälle und sollen, als Repräsentanten der drei Klassen, die eingeführte Semiquantifizierung verdeutlichen.

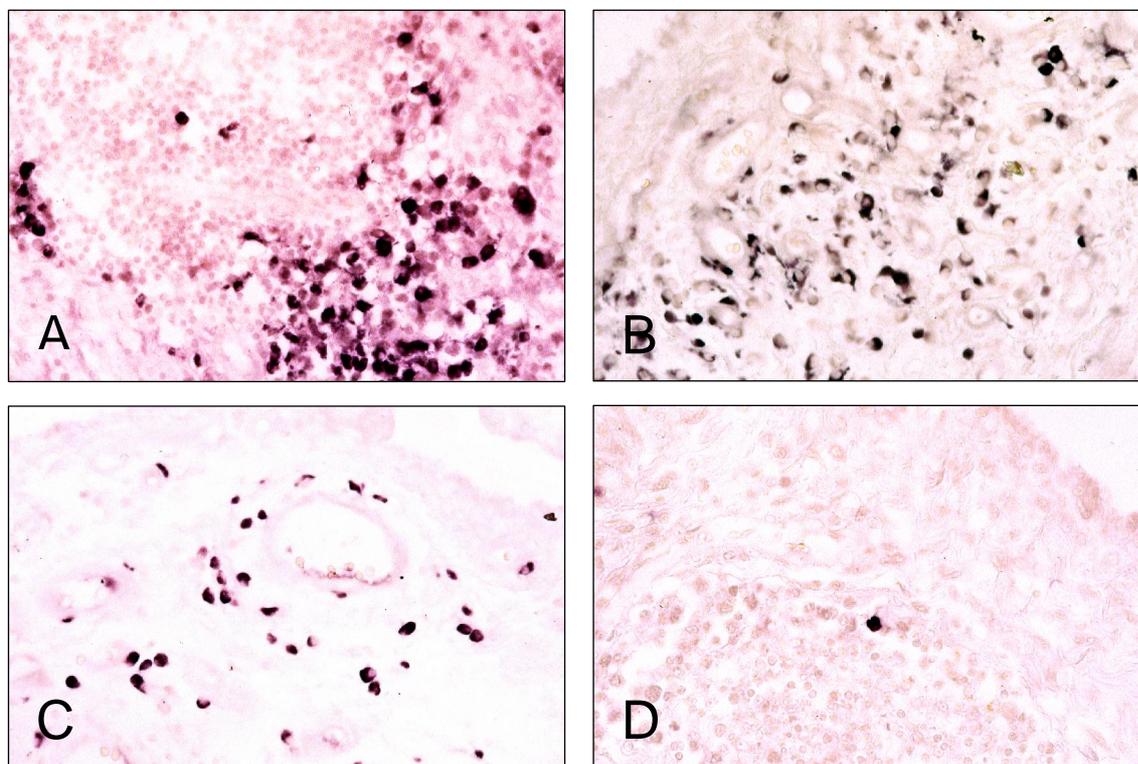


Abbildung 12 Parvovirus B19 IHC an Synovialgewebe, detektiertes VP1- und VP2-Protein ist NBT-markiert (dunkelblau/violett).

- A) RA, zahlreiche positive Zellen (Gruppe III, 400x)
- B) rA/S, viele positive Zellen (Gruppe III, 400x)
- C) RA, einige positive Zellen (Gruppe II)
- D) RA, singuläre virusproduzierende Zelle (Gruppe I, 400x)

Um eine feinere Abstufung zwischen Fällen mit positiven Einzelzellen (Gruppe I) und Fällen mit einigen, aber homogen verteilten, virusbeladenen Zellen (Gruppe II) zu schaffen, wurde für einzelne Fälle mit rein regional begrenzter Darstellung mehrerer viruspositiver Zellen eine zusätzliche Zwischengruppe I/II definiert.

Fälle reaktiver Arthritiden und Synovitiden mit einer Parvovirus B19-Last (n=10) waren hauptsächlich in der Gruppe I (4/10) oder mit einer inhomogenen Verteilung zwischen Gruppe I und II (3/10) vertreten. Zwei Fälle (2/10) wurden in Gruppe II klassifiziert und lediglich ein Fall (1/10) erfüllte die Kriterien der Gruppe III.

Die vier Parvovirus B19-positiven PSA-Fälle wurden der Gruppe I (2/4), Gruppe II (1/4) und Gruppe III (1/4) zugeteilt.

Die Mehrzahl der positiven RA-Fälle (26) waren Vertreter der stark Virus-Protein-haltigen Gruppen II (9/26) und III (11/26). Mit nur singulären positiven Zellen fielen vier Proben (4/26) in die Klasse I und zwei weitere Fälle (2/26) nahmen aufgrund inhomogener Verteilung eine Mittelstellung zwischen Gruppe I und II ein.

Einer der Normalfälle (1/2) wurde ebenfalls mit mehreren isolierten virustragenden Zellen in Gruppe I/ II eingeordnet.

*Tabelle 9 Semiquantitative Verteilung (Gruppe I – III) der Parvovirus B19- positiven Fälle absolut und aufgeschlüsselt nach den unterschiedlichen Arthritis Entitäten*

Parvovirus B19	Gruppe I	Gruppe I/II	Gruppe II	Gruppe III
+ Fälle ( $\Sigma$ n = 41)	<b>10</b> (24,3%)	<b>6</b> (14,6%)	<b>12</b> (29,3%)	<b>13</b> (31,7%)
nach Diagnose				
RA ( $\Sigma$ n = 26)	<b>4</b> (15,4%)	<b>2</b> (7,7%)	<b>9</b> (34,6%)	<b>11</b> (42,3%)
PSA ( $\Sigma$ n = 4)	<b>2</b> (50 %)	---	<b>1</b> (25 %)	<b>1</b> (25 %)
rA/S ( $\Sigma$ n = 10)	<b>4</b> (40 %)	<b>3</b> (30 %)	<b>2</b> (25 %)	<b>1</b> (10 %)
nS ( $\Sigma$ n = 1)	---	<b>1</b>	---	---

*Gruppe I (+), viruspositive Einzelzellen; Gruppe II (++) , einige viruspositive Zellen, homogen verteilt; Gruppe III (+++), zahlreiche viruspositive Zellen; Gruppe I/II (+/++), inhomogen verteilt nur regional positive Zellen; RA, Rheumatoide Arthritis; PSA, Psoriasis Arthritis; rA/S, reaktive Arthritis/Synovitis; nS, normale Synovia*

Der jeweilige Anteil der einzelnen Arthritis-Entitäten an den unterschiedlichen Gruppen variierte. Aus Tabelle 9 wird eindrücklich ersichtlich, dass sich Fälle mit einer ausgeprägten Viruslast (Gruppe III,  $\Sigma$  13) fast ausschließlich aus Proben mit der Diagnose RA (11/13, 84,6%) rekrutierten. Zusätzlich erfüllte ein PSA-Fall die Kriterien der Gruppe III. Eine vergleichbar hohe Anzahl an viruspositiven Zellen konnte nur in einem Fall der reaktiven Arthritiden identifiziert werden.

Ein ähnliches Verteilungsmuster zeigte sich auch innerhalb der Gruppe II. Von den 12 Fällen mit entsprechender Viruslast entstammten neun Fälle (9/12, 75%) dem RA-Kollektiv, ein weiterer Fall der PSA-Gruppe. Lediglich in zwei Fällen aus der rA/S-Kontrollgruppe (2/12, 17%) konnte eine vergleichbare Virusprotein-Expression beobachtet werden.

Während mit insgesamt 76,9% der Großteil der Parvovirus B19-positiven Fälle (20/26) in den Gruppen II und III vertreten war, waren nur 30% der positiven rA/S-Proben (3/10) der Gruppe II und Gruppe III zuzuordnen. Umgekehrt waren 70% der B19-positiven rA/S-Fälle in den Gruppen I und I/II zu finden.

Zusammenfassend lässt sich aus Tabelle 7 ableiten, dass der Anteil der Parvovirus B19-positiven Fälle mit fast 90% unter den RA-Synovien und mit 66% unter den PSA-Synovien signifikant höher ist verglichen mit einem Anteil von 38,5% unter den rA/S-Synovien.

Darüber hinaus zeigen die in Tabelle 9 aufgeführten Daten, dass unter den Parvovirus B19-positiven RA-Fällen das Ausmaß der Infektion (Anzahl positiver Zellen) im Vergleich zur rA/S Kontrollgruppe signifikant höher ist.

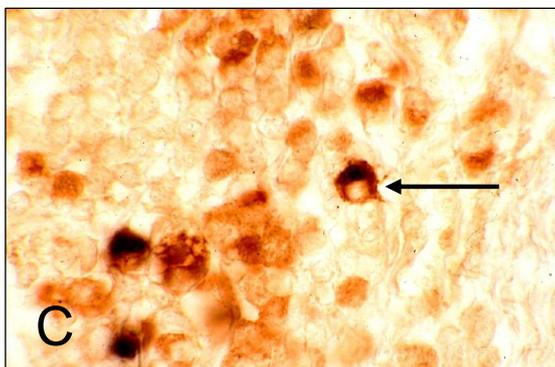
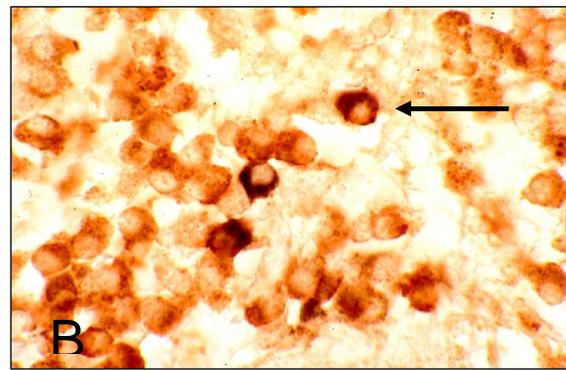
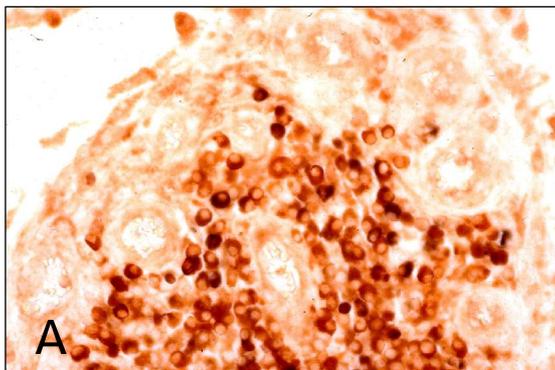
Die angewandte IHC mit anschließender Hellfelddetektion erlaubte Aussagen über den morphologischen Kontext. Die Strukturproteine VP1 und VP2 wurden ausschließlich in innerhalb des Synovialstromas gelegenen Zellen nachgewiesen. Allerdings konnte ein Tropismus zu Synovia lining-Zellen oder Synoviozyten nicht nachgewiesen werden. In einzelnen Fällen zeigten sich auch intravasal lokalisierte, virus-tragende Zellen.

### 5.1.2 Zelltypcharakterisierung mittels Parvovirus B19-VP1/VP2 und CD3/CD20-Immundoppelfärbung

Die zytomorphologische Erscheinung und Lokalisation der Parvovirus B19-positiven Zellen deutete auf einen lymphozytären Ursprung hin. Eine eindeutige Zelltypcharakterisierung gelang mittels einer immunhistochemischen Doppelmarkierung lymphozytärer Epitope (CD20 bzw. CD3) im Anschluss an die Parvovirus B19-IHC.

Durch die IHC-Markierung der lymphozyten-spezifischen Epitope konnten die virus-tragenden Zellen eindeutig als B-Lymphozyten (CD20) bzw. als T-Lymphozyten (CD3) charakterisiert werden.

Die folgenden Abbildungen zeigen das Ergebnis einer Zelltypdifferenzierung mittels einer CD3- bzw. CD20- und Parvovirus B19-spezifischen Immundoppelfärbung. Da die Targets der Doppel-IHC an der Zelloberfläche (CD-Epitope, AEC rotbraun) oder im Zytoplasma (VP1/VP2-Protein, NBT blau-violett) lokalisiert waren, ließen sich die unterschiedlichen Markierungen z.T. durch ihre Lokalisation sowie durch eine Farbanalyse identifizieren und differenzieren.



*Abbildung 13 Immundoppelfärbung an Synovialgewebeschnitten*

- A) Parvovirus **B19-VP1/VP2** (NBT, **dunkelblau-violett**) und T-Lymphozyten-spezifisches **CD3** (AEC, **rotbraun**) in RA-Synovialgewebe; B19-positive Zellen und CD3-positive T-Lymphozyten sind kolokalisiert. (400x)*
- B) **CD3** und **B19-VP1/VP2** doppelmarkierte T-Lymphozyten*
- C) Parvovirus **B19-VP1/VP2** (NBT, **dunkelblau-violett**) und B-Lymphozyten-spezifisches **CD20** (AEC, **rotbraun**) in RA Synovialgewebe, zwei B19-positive Zellen werden über die CD20-Doppelmarkierung als virus-tragende B-Lymphozyten charakterisiert*

Abbildung 13A zeigt im Bereich einer folliculären lymphozytären Infiltration kolokalisierte T-Lymphozyten (CD3) und Parvovirus B19-positive Zellen. Die simultane Doppelfärbung der Strukturproteine-VP1/VP2 und der CD3- (Abb. 13B) bzw. CD20-Oberflächenmoleküle (Abb. 13C) an jeweils identischen Zellen bestätigte den Verdacht, dass es sich um virus-infizierte Lymphozyten handelt.

Die obigen Befunde wurden in mehreren Übersichtsarbeiten und in zwei Fallvorstellungen veröffentlicht (Mehraein et al., 2003; Mehraein et al., 2004; Mehraein et. al, 2004; Lennerz et al., 2003).

## 5.2 Cytomegalievirus (CMV)-Untersuchungen

### 5.2.1 Nachweis einer synovialen CMV-Infektion (DNA-ISH)

Das Synovia-Kollektiv wurde unter Einsatz einer kommerziell erworbenen, genomischen DNA-Sonde (ENZO) mittels ISH an Paraffinschnitten auf eine CMV-Präsenz analysiert. In CMV-positiven Fällen wurde der Virusnachweis zusätzlich mit einer biotinylierten pp65-cDNA-Sonde verifiziert (das CMV-pp65-cDNA-tragende Plasmid wurde von PD Dr. Martina Sester, Innere Medizin, Universität des Saarlandes, zur Verfügung gestellt).

Beide Sonden lieferten im Wesentlichen konkordante Befunde. Unter Verwendung der kommerziellen CMV-Sonde zeigten sich zahlreiche, jedoch z.T. schwach markierte CMV-positive Zellen (APAAP-Detektionssystem). Durch den Einsatz eines Tyramid-Verstärkungssystems konnte die Sensitivität eindrucklich erhöht werden. Insbesondere bei Einsatz der pp65-Sonde kamen überwiegend distinkte, nukleär lokalisierte Signale zur Darstellung (Abb. 14D).

In 15 der 63 (23,8%) untersuchten Synovialisproben konnte qualitativ CMV-DNA nachgewiesen werden. Bei Aufschlüsselung der positiven Fälle nach Arthritis-Entität gehörten neun Fälle (9/15, 60%) der Kategorie RA an. Drei Fälle hatten die klinische Diagnose PSA (3/15, 20%); drei Fälle (3/15, 20%) fielen in die Gruppe der rA/S.

Unter Berücksichtigung der Probenumfänge der einzelnen Arthritis-Entitäten wurden in 31% (9/29) der RA-Fälle und 50% (3/6) der PSA-Fälle CMV-DNA identifiziert. Dahingegen wurde CMV-DNA in lediglich 11,5% (3/26) der rA/S-Fälle nachgewiesen.

Tabelle 10 CMV-DNA-positive Fälle nach unterschiedlichen Arthritis-Entitäten

Klinische Diagnose	RA	PSA	rA/S	nS	$\chi^2$ -Test (p-Wert)
Gesamtanzahl der Fälle	29	6	26	2	
<b>CMV-DNA-positive Fälle (ISH)</b>	<b>9</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	---	<b>0,083</b>
	(31%)	(50%)	(11,5%)		

CMV, Cytomegalievirus; RA, Rheumatoide Arthritis; PSA, Psoriasis Arthritis; rA/S, reaktive Arthritis/Synovitis; nS, normale Synovia; ISH, in situ-Hybridisierung; die p-Wert Berechnung erfolgte unter Anwendung des  $\chi^2$ -Testes.

### 5.2.2 Zelltypisierung

Die Zelltyp-Charakterisierung der CMV-positiven Zellen erfolgte anhand zytomorphologischer Kriterien unter Berücksichtigung des histomorphologischen Kontextes.

Die Mehrzahl der CMV-positiven Zellen konnte entweder stromal, infiltrativen Lymphozyten oder aber Synovial lining-Zellen zugeordnet werden. In Einzelfällen konnte CMV-DNA auch in Synovialfibroblasten bzw. Zellen des benachbarten Bindegewebes dargestellt werden.

Die folgenden Abbildungen demonstrieren exemplarisch Ausmaß und Tropismus der CMV-Infektion.

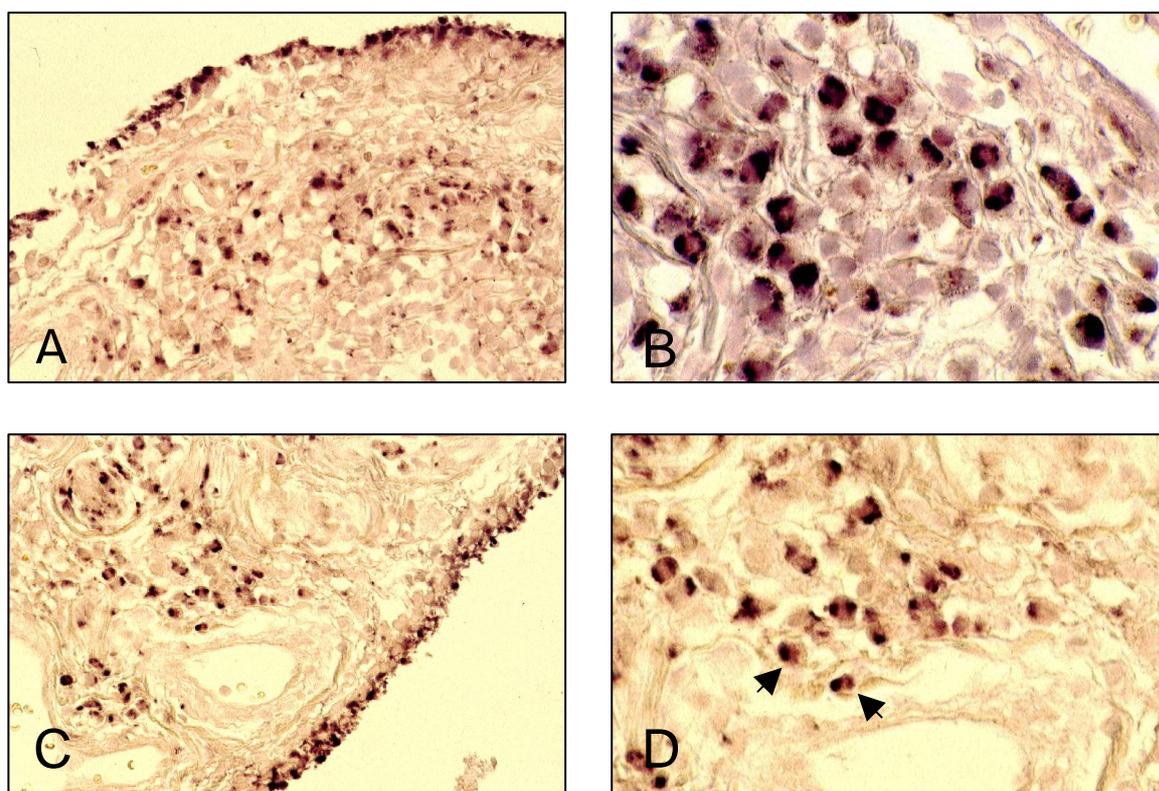


Abbildung 14 *CMV-Detektion an Paraffin-eingebettetem Synovialgewebe mittels CMV-DNA- in situ-Hybridisierung mit pp65-Sonde; Virus-DNA wurde unter Verwendung des APAAP-Systems mittels NBT (dunkelblau/violett) markiert.*  
*A) und C) hohe Zahl CMV-positiver lining cells und Areale mit viruspositiven lymphatischen Zellen im Synovialstroma (100x)*  
*B) und D) nukleäre Lokalisation der distinkten Signale in Vergrößerung (400x)*

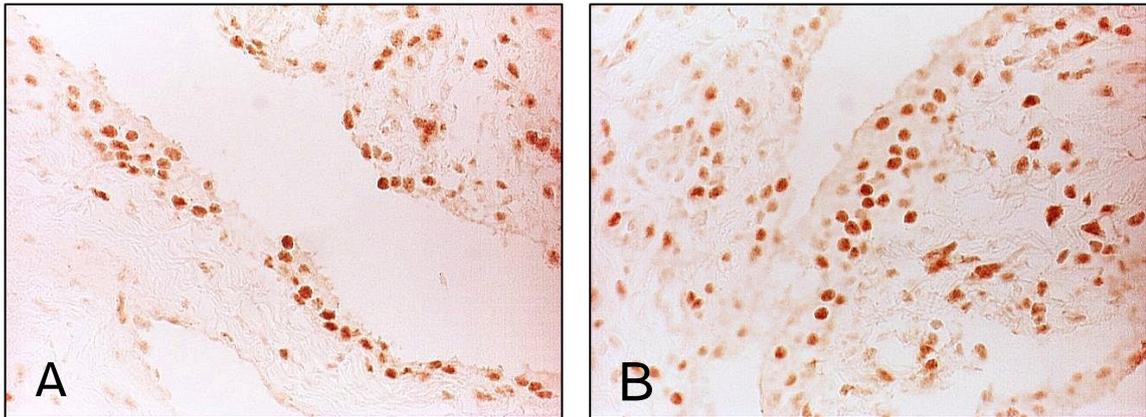


Abbildung 15 CMV-Detektion an Paraffin-eingebettetem Synovialgewebe mittels CMV-DNA-in situ-Hybridisierung, Virus-DNA-tragende Zellen wurden bei erhöhter Sensitivität durch Einsatz eines Tyraminverstärkungssystems mittels DAB (braun) markiert. Erhöhte Anzahl viruspositiver Zellen in sowohl Synovial-Deckzellschicht als auch -Stroma; nukleäre Markierung.

### 5.2.3 Beurteilung des Aktivitätsgrades der Infektion

Das humane Cytomegalievirus ist sowohl zur lytischen als auch zur latenten Infektion der Wirtszellen fähig. Zur Erfassung von Virusreplikation und damit eines lytischen Zellzyklus wurden die 15 CMV-DNA-positiven Fälle immunhistochemisch auf CMV-early Antigen (EA) untersucht. Das CMV-early Antigen wird im Verlauf der Virusproduktion synthetisiert.

CMV-EA konnte in sechs der neun CMV-DNA-positiven RA-Fälle (6/9, 66,6%) und in zwei von drei positiven PSA-Fällen (2/3) detektiert werden. Bezogen auf den Umfang der einzelnen Kollektivgruppen konnte somit in 20,7% (6/29) der RA- und in 33,3% (2/6) der PSA-Fälle eine replikative Aktivität identifiziert werden. Dahingegen konnte in beiden analysierten CMV-positiven rA/S-Fällen kein EA gezeigt werden.

Alle CMV-EA-positiven Synovialisproben zeigten jedoch eine auf nur wenige Zellen beschränkte EA-Expression. Somit ist lediglich von einer limitierten Syntheseaktivität auszugehen. EA-positive Zellen zeigten im Gegensatz zum Großteil der CMV-DNA-positiven Zellen CMV-typische zytopathische Charakteristika, u.a. den intranukleären „Eulenaugen“-Effekt (Abb. 16B).

Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass in der Mehrzahl der analysierten arthritischen Synovialgewebe mit positivem CMV-Nachweis eine latente CMV-

Infektion bzw. eine überwiegend latente Infektion mit geringgradiger Aktivierung vorlag.

Tabelle 11 CMV-EA- positive Fälle nach unterschiedlichen Arthritis-Entitäten

Klinische Diagnose	RA	PSA	rA/S	nS	$\chi^2$ -Test
Gesamtanzahl der Fälle	29	6	26	2	(p-Wert)
Gesamtanzahl CMV-DNA+ Fälle (ISH)	9	3	3	---	
<b>CMV-EA-Detektion (IHC) in CMV-DNA positiven Fällen</b>	<b>6/9</b>	<b>2/3</b>	--- <sup>a</sup>	n.a.	<b>0,24</b>

CMV, Cytomegalievirus; RA, Rheumatoide Arthritis; PSA, Psoriasis Arthritis; rA/S, reaktive Arthritis/Synovitis; nS, normale Synovia; IHC, Immunhistochemie; ---, negativ; n.a., nicht analysiert. <sup>a</sup> ein CMV-DNA- positiver rA/S-Fall konnte aufgrund Materialmangels nicht der IHC zugeführt werden. Die p-Wert-Berechnung erfolgte unter Anwendung des  $\chi^2$ -Testes

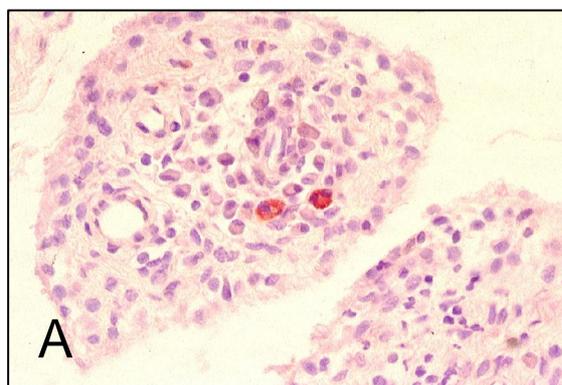
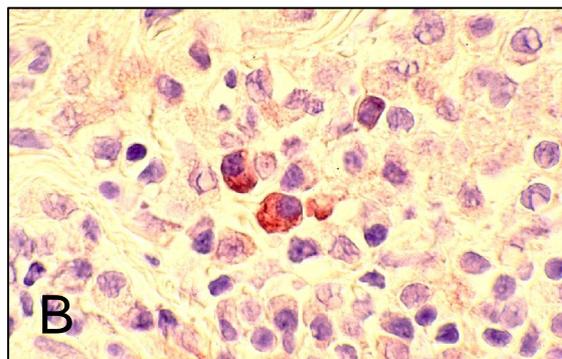


Abbildung 16

Immunhistochemische Detektion des CMV-early Antigen (EA) mittels Peroxidase- mediiertes AEC-Färbung (rot) in PSA-Synovialgewebe. A) Protein-positive Zellen in einem lymphoplasmazellulären Infiltrat (200x, Hämatoxylin-Gegenfärbung)



B) CMV-typische cytopathische Zelleffekte in EA-positiven Zellen (400x, Hämatoxylin-Gegenfärbung)

Zusammenfassend konnte eine persistierende CMV-Infektion der Synovialzellen ungefähr dreimal häufiger unter den RA-Fällen (31%) und PSA-Fällen (50%) als in der reaktiven Vergleichsgruppe (11,5%) nachgewiesen werden, wobei eine replikative Aktivität in 66% der CMV-DNA-positiven RA- und PSA-Fälle, nicht jedoch unter den rA/S-Fällen gefunden wurde.

Die dargestellten CMV-Ergebnisse wurden publiziert (Mehraein et al., 2004; Mehraein et al., 2004).

## 5.3 Epstein-Barr Virus (EBV)-Untersuchungen

### 5.3.1 Nachweis einer EBV-Infektion (EBER-ISH)

Die EBER 1/2-Moleküle werden sowohl im Latenzstadium als auch in der lytischen Zyklusphase einer EBV-Infektion synthetisiert. Der Nachweis von EBER mittels RNA-ISH gilt unabhängig vom jeweiligen Infektionszyklus als das sensitivste Verfahren zur Erfassung einer EBV-Infektion.

Beim Screening des Synovia-Kollektivs mittels EBER 1/2-ISH konnten in 23 der 63 Synovialproben (23/63, 36,5%) EBV-positive Zellen identifiziert werden. Im Detail verteilten sich 14 auf die RA-Gruppe (14/29, 48,2%), 3 auf die PSA-Gruppe (3/6, 50%) und 6 auf das Kontrollkollektiv rA/S (6/26, 31%). Die EBER-positiven Fälle rekrutierten sich zu 61% (14/23) aus RA-, zu 13% (3/23) aus PSA- und zu 26% (6/23) aus rA/S-Fällen (in keinem der beiden normalen Synovialgewebe wurde EBER 1/2 nachgewiesen).

EBER 1/2-positive Zellen wurden in Arealen ausgeprägter lymphozytärer Infiltration, diffus innerhalb des Synovialstromas, jedoch auch im Bereich der Synovia-Deckzellschicht (synovial lining cells) beobachtet (Abb. 17).

Evidente Unterschiede in Anzahl sowie histologischer Herkunft der EBER-positiven Zielzellen führten jedoch zu einer semiquantitativen Klassifikation. Zur differenzierten Betrachtung diente die Definition einer „relevanten“ Infektion bei Erfüllung quantitativer und/oder qualitativer Kriterien. Als quantitatives Einschlusskriterium musste eine ausgeprägte Synovialis-Infiltration mit EBER 1/2-positiven Lymphozyten vorliegen (evident bei 2 RA-Fällen). Qualitative Bedingungen erfüllte ein EBER 1/2-Nachweis in Synovial lining-Zellen, synovialen Stroma- sowie Bindegewebszellen, welcher in 3 RA-, 1 PSA- sowie 1 rA/S-Probe dargestellt werden konnte.

Unter dieser Betrachtungsweise zeigten sieben der 23 EBER-positiven Fälle (7/23, 30,4%) und bezogen auf das Gesamtkollektiv 7/63 (11,1%) eine definitionsgemäß relevante EBV-Infektion. Bei Differenzierung nach den Arthritis-Entitäten ergab sich folgende Verteilung: 5 RA-Fälle (5/29, 17,2%), 1 PSA- (1/6, 16,7%) und 1 rA/S-Fall (1/26, 3,8%). Diese Zahlen belegen, dass eine entsprechend relevante EBV-Infektion in RA-Synovialgewebe signifikant häufiger ist als in rA/S.

Die restlichen 16 Fälle (16/23, 69,6%) zeigten vereinzelte, weit gestreute EBER-positive Zellen und wurden in einer Kategorie mit „Einzelzellsignalen“ subsumiert. Diese Fälle verteilten sich im Detail auf 9 RA- (9/29, 31%), 2 PSA- (2/6, 33,3%) und 5 rA/S-Fälle (5/26, 19,2%).

Die in dieser Gruppe beobachteten Einzelzellen waren vor allem im synovialen Stroma lokalisiert und histo-zytomorphologisch mit eingewanderten Lymphozyten vereinbar. Die singulären Lymphozytensignale könnten dem, für eine latente EBV-Infektion klassischen, Befund von B-Zellen als Virus-Reservoir entsprechen.

Tabelle 12 Auswertung EBER1/2 RNA-ISH nach Arthritis-Entitäten

Klinische Diagnose	RA	PSA	rA/S	nS	
Gesamtanzahl der Fälle (n)	n = 29	n = 6	n = 26	n = 2	∑ n = 63
EBER positive Fälle (ISH) (p)	<b>14</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	---	∑ p = 23
(p/n)	(48,2%)	(50%)	(23,1%)		
relevante Infektion (S)	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	---	∑ S = 7
(S/n)	(17,2%)	(16,7%)	(3,8%)		
Einzelzellsignale (L)	<b>9</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	---	∑ L = 16
(L/n)	(31%)	(33,3%)	(19,2%)		

EBER, EBV encoded small RNA; RA, Rheumatoide Arthritis; PSA, Psoriasis Arthritis; rA/S, reaktive Arthritis/Synovitis; nS, normale Synovia; ISH, in situ-Hybridisierung; S, Synovialzellen; L, lymphatische Zellen

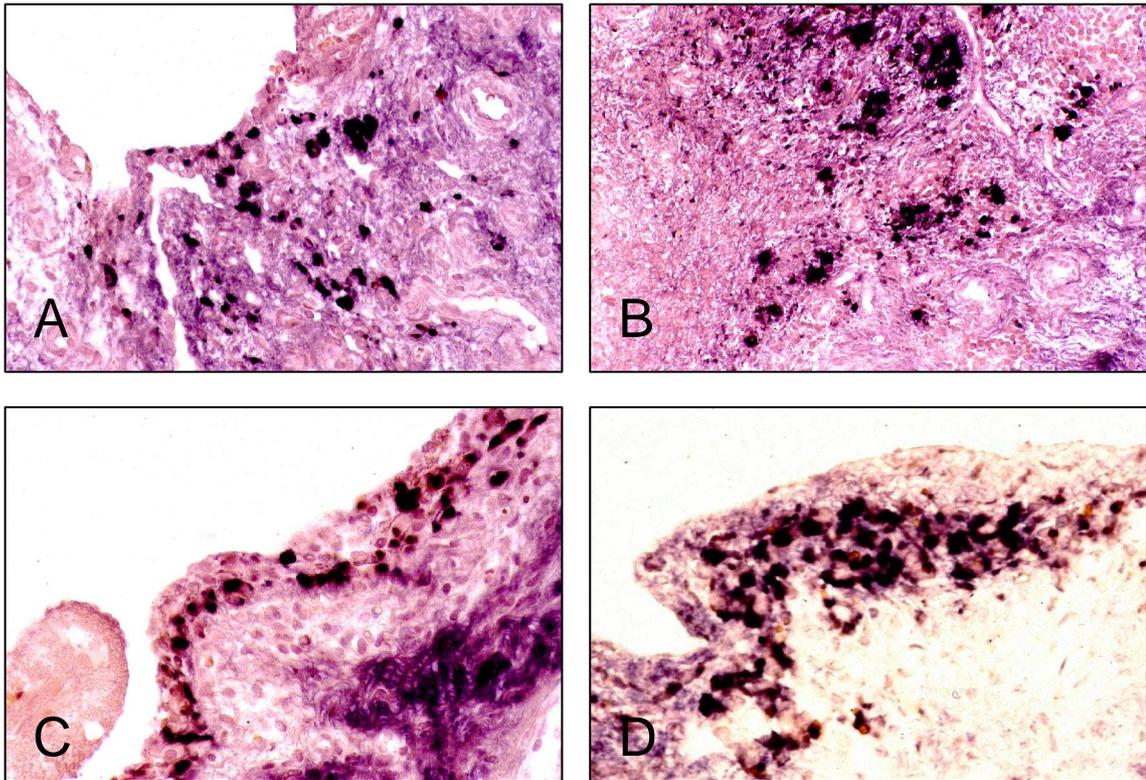


Abbildung 17 *EBER 1/2-RNA-in situ-Hybridisierung an Paraffin eingebettetem Synovialgewebe, Detektion über alkalische Phosphatase-mediierte NBT (blau-violett) Farbreaktion; Beispiele aus der Kategorie „relevante“ EBV-Infektion*

- A) *RA-Synovialis, EBER 1/2-positive lining cells und -positive Zellen im Synovialstroma (400x)*
- B) *RA-Synovialis, EBER 1/2-positive Zellen im Bereich stromaler lymphozytischer Infiltration (200x)*
- C) *rA/S-Synovialis, EBER 1/2 markierte Zellen hauptsächlich im Synovial lining cells-Kompartiment lokalisiert (400x)*
- D) *ausgeprägter EBER1/2-Nachweis in den Synovial lining cells (400x)*

### 5.3.2 Charakterisierung der EBV-Infektionsphase

Der Nachweis von EBER 1/2-Molekülen belegt das Vorliegen einer EBV-Infektion, lässt aber keine Unterscheidung der Infektionsphase (lytisch versus latent) zu. Je nach Aktivitätsstadium differieren die synthetisierten Virus-Proteine. Zur eindeutigen Analyse des vorliegenden Infektionsstatus wurde an allen 23 primär EBER-positiven Synovialgeweben eine Charakterisierung zyklusspezifischer EBV-Proteine mittels Immunhistochemie durchgeführt.

Zum Nachweis einer latenten Infektion wurde die Expression des latenten Membranproteins LMP1 untersucht.

Um eine Aussage über das Vorliegen einer lytischen EBV-Infektion zu ermöglichen, erfolgte eine Analyse auf das BZLF1-Protein.

In allen EBER-positiven Fällen konnte eine LMP1-Expression in zur EBER-ISH vergleichbaren Zellen und korrespondierenden Lokalisationen nachgewiesen werden. Die Sensitivität der LMP1-IHC erschien in den meisten Fällen der EBER-ISH vergleichbar, in einzelnen Fällen wurde eine überraschend größere Anzahl positiver Zellen beobachtet (Abb. 18).

Insbesondere bemerkenswert belegte ein evidenter LMP1-Nachweis in Synovial lining-Zellen eine ausgeprägte, latente Virusinfektion auch eigentlicher Synovialzellen (18 A).

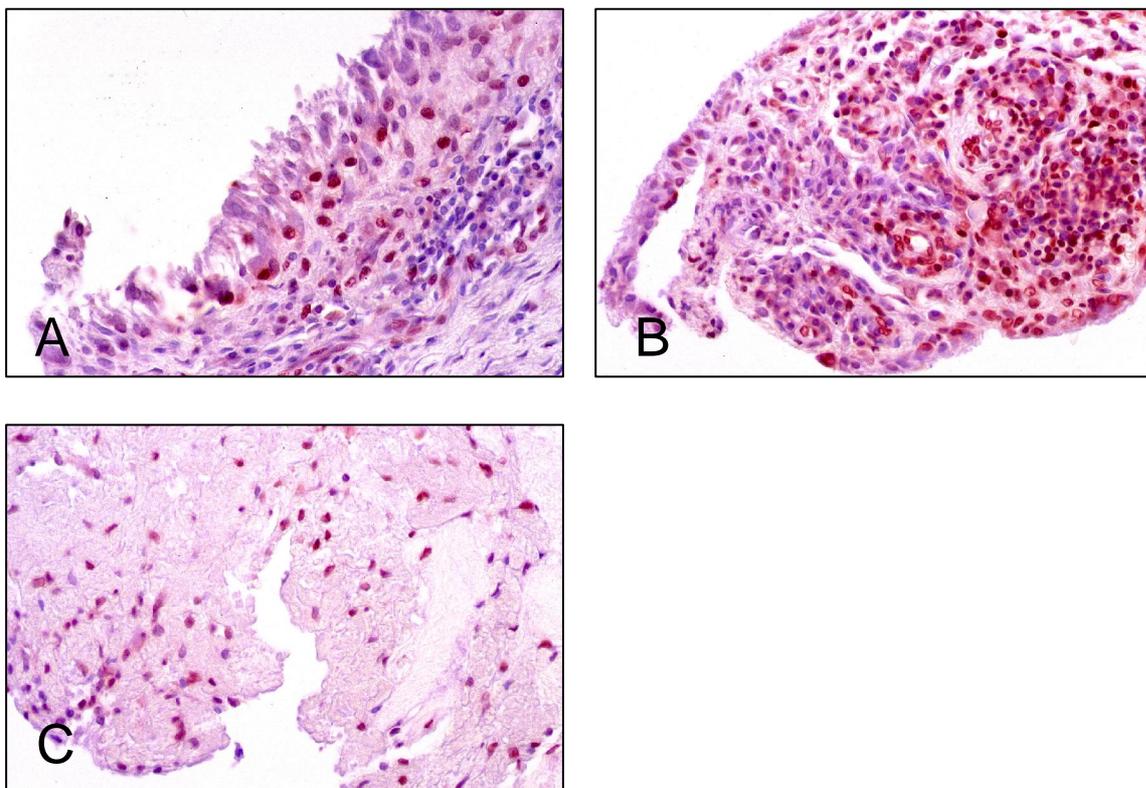


Abbildung 18 LMP1-Immunhistochemie am Paraffin-eingebetteten Synovialgewebe von RA-Patienten; Detektion über eine HRP-medierte AEC-Färbung (rot) mit Hämatoxylin-Gegenfärbung  
A) Nachweis von LMP1-positiven Synovial lining-Zellen und infiltrativen lymphatischen Zellen (400x)  
B) wenige LMP1-positive synovial lining-Zellen neben zahlreichen positiven Lymphozyten, als folliculäres Infiltrat (400x)  
C) LMP1-Markierung in Synovialfibroblasten (200x)

Im Gegensatz zur Latenz-Untersuchung (LMP) identifizierte die Analyse aller 23 EBER1/2-positiven Proben lediglich drei Fälle mit ausschließlich singulären BZLF1-positiven Zellen (3/23, 13%), was als Infektion mit geringer replikativer Aktivität gedeutet wurde. Es handelte sich hierbei um zwei RA-Fälle und einen PSA-Fall. Die wenigen BZLF1-exprimierenden Zellen waren im synovialen Stroma lokalisiert; in der Synoviozyten-Deckzellschicht war keine BZLF1-Expression zu identifizieren. Alle drei BZLF1-positiven Fälle wurden in der EBER1/2-Analyse als „relevante“ EBV-Infektionen charakterisiert und zeigten zudem eine ausgeprägte LMP1-Expression.

Zur Komplettierung der EBV-Analysen wurden die sieben Fälle mit relevanter EBV-Infektion zusätzlich auf EBNA1 mittels IHC untersucht. Das EBNA1 ist ebenfalls ein Marker für das Latenzstadium. Die Lokalisation der EBNA1-Signale in der Synoviozyten-Deckzellschicht (Synovial lining-Zellen) und in den stromal-infiltrativen Lymphozyten bestätigte die Vorbefunde in allen analysierten Proben.

Bei der zusammenfassenden Beurteilung der durchgeführten EBV-Protein-Analysen konnte bei allen EBV-positiven arthritischen Synovialgeweben eine latente Infektion mit nur in Einzelfällen geringer replikativer Komponente demonstriert werden.

Die oben vorgestellten Ergebnisse wurden in einer Übersichtsarbeit und in einem case report veröffentlicht (Mehraein et al., 2004a; Mehraein et al., 2004b).

Tabelle 13 resümiert anschaulich die Befunde aller EBV-Untersuchungen unter Berücksichtigung des morphologischen Kontextes.

Tabelle 13 Ergebnisse der EBV-Analysen in 23-EBER1/2-positiven Synovialproben (RA, PSA, rA/S, nS)

Anzahl Der Fälle	Klinische Diagnose	Fall Nummer	EBER 1/2		LMP1		EBNA1		BZLF1			
			ISH	S L	IHC	S L	ICH	S L	IHC	S L		
14	Rheumatoide Arthritis	2	-	+	-	+	n.a.	-	-	-	-	
		4	-	+	-	+	n.a.	-	-	-	-	
		5	-	+	-	+	n.a.	-	-	-	-	
		6	-	+	-	+	n.a.	-	-	-	-	
		8	+	++	++	+++	++	++	-	+	-	+
		10	-	+	-	+	n.a.	-	-	-	-	-
		13	-	+	-	+	n.a.	-	-	-	-	-
		18	++	++	+++	+++	++	++	-	+	-	+
		19	-	++	-	++	n.a.	-	-	-	-	-
		20	-	+	-	+	n.a.	-	-	-	-	-
		22	-	++	-	++	+	++	-	-	-	-
		24	++	++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
		25	-	+	-	+	n.a.	-	-	-	-	-
		27	-	+	-	+	n.a.	-	-	-	-	-
3	PSA	30	++	++	+++	+++	++	++	-	+	-	+
		31	-	+	-	+	n.a.	-	-	-	-	-
		35	-	+	-	+	n.a.	-	-	-	-	-
6	rA/S	39	-	+	-	+	n.a.	-	-	-	-	
		41	++	+	++	+	+	+	-	-	-	-
		44	-	+	-	+	n.a.	-	-	-	-	-
		46	-	+	-	+	n.a.	-	-	-	-	-
		49	-	+	-	+	n.a.	-	-	-	-	-
		56	-	+	-	+	n.a.	-	-	-	-	-

EBV-positive Synovialfälle unterschiedlicher Arthritis Entitäten, nachgewiesen mittels EBER1/2-in situ Hybridisierung (ISH) und immunhistochemischer (IHC) Färbung; EBV, Epstein-Barr Virus; RA, Rheumatoide Arthritis; PSA, Psoriasis Arthritis; rA/S reaktive Arthritis/Synovitis; EBER1/2, EBV encoded small RNA1 und RNA2; LMP1, latent membrane protein 1; EBNA EBV nuclear antigen 1; S, synovial lining cells; L, lymphatische Zellen; +++, zahlreiche positive Zellen; ++, signifikante Anzahl positiver Zellen; +, singuläre, positive Zelle/Einzelzellphänomen; -, negativ; n.a., nicht analysiert; nach Definition (siehe Text) „relevante“ EBV Infektion.

## 5.4 Metaanalyse einer koinzidenten Multivirusinfektion

Um die Prävalenz einer relevanten koinzidenten Doppel- oder Multivirusinfektion der Synovialproben zu evaluieren, wurden die am selben Kollektiv erhobenen Daten der Parvovirus B19-, CMV- und EBV- Untersuchungen kombiniert und unter dem Aspekt einer Simultaninfektion ausgewertet.

In diese Meta-Analyse wurden lediglich Befunde mit einer definitionsgemäß „relevanten“ Virusinfektion einbezogen. Als relevante CMV-Infektion der Synovialis wurde ein evidenter CMV-DNA-Nachweis (ISH) innerhalb der Synoviozyten-Deckzellschicht definiert. Zur Beurteilung einer relevanten EBV-Infektion wurden die Detektion EBER 1/2-positiver Synovial lining-Zellen und/oder der Nachweis ausgeprägter EBER 1/2-positiver Lymphozyteninfiltrate (EBER-RNA-ISH) als Relevanzcharakteristika herangezogen. Für eine entsprechend relevante Parvovirus B19-Infektion wurde ein relevanter VP1/VP2-Nachweis (IHC) entsprechend der semiquantitativen Gruppen II und III (vgl. semiquantitative ParvoB19-Klassifikation) als Einschlusskriterium zugrunde gelegt.

Folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Anzahl und die Verteilung der in die Metaanalyse einbezogenen Fälle.

Tabelle 14 Synovialproben mit definitionsgemäß relevanter Virusinfektion aufgeschlüsselt nach Arthritis-Entität und Virustyp

Klinische Diagnose Gesamtanzahl	Relevante Infektion der Synoviaprobe durch					
	EBV (%)		CMV (%)		ParvoB19 (%)	
RA (n=29)	5	(17,2%)	9	( 31%)	20	(68,9%)
PSA (n= 6)	1	(16,7%)	3	( 50%)	2	(33,3%)
rA/S (n=26)	1	( 3,8%)	3	(11,5%)	3	(11,5%)
( $\Sigma$ n=61)	7		15		26	
$\chi^2$ -Test p-Werte	0,32		0,083		<0,001	

Einschlusskriterien für eine "relevante" Infektion wurden im Text für jedes Virus definiert. EBV, Epstein-Barr Virus; CMV, Cytomegalievirus; ParvoB19, Parvovirus B19; RA, Rheumatoide Arthritis; PSA, Psoriasis Arthritis; rA/S, reaktive Arthritis/Synovitis.

Eine relevante Infektion mit **mindestens** einem der drei untersuchten Viren konnte in 50,8% (31/61) der arthritisch veränderten Synovialproben nachgewiesen werden. Die Mehrzahl der Fälle mit einer relevanten Virusinfektion rekrutierte sich mit 21 Proben aus der RA-Fraktion (21/29, 72,4% der RA-Fälle) und 4 Proben aus der PSA-Gruppe (4/6, 66,7%). Unter den reaktiven Arthritiden/Synovitiden konnte dahingegen lediglich in 6 Fällen (6/26, 23,1%) eine singuläre oder höhergradige, relevante Infektion nachgewiesen werden.

Eine relevante singuläre Synovialinfektion (**Monoinfektion**) durch **nur eines** der drei Viren wurde in 29,5% (18/61) der Arthritis-Fälle (n=61) gefunden. Bei einer nach Arthritis-Entität gewichteten Betrachtung fielen 11 Fälle auf die RA-Gruppe, 2 Proben entstammten der PSA-Gruppe und 5 Fälle rekrutierten sich aus der rA/S-Kontrollgruppe. Eine Differenzierung der „Monoinfektionen“ nach dem Virustyp zeigte eine Dominanz des Parvovirus B19 (13/18, 72,2%) gegenüber CMV (4/18, 22,2%) und EBV (1/18, 5,6%). Eine relevante, singuläre (Mono-) Parvovirus B19-Infektion wurde in zehn RA-Fällen (10/29, 34,5% der RA-Fälle), in einem PSA-Fall (1/6, 16,7%) und zwei rA/S-Fällen (2/26, 7,7%) nachgewiesen. Lediglich eine rA/S-Probe zeigte eine relevante Mono-EBV-Infektion. Mono-CMV-Infektionen waren mit einem RA-, einem PSA- und zwei rA/S-Fällen über die Arthritis-Entitäten ungefähr gleich verteilt.

Eine relevante **Infektion mit zwei differenten Viren (Doppelinfektion)** konnte in zehn arthritisch veränderten Synovialproben (10/61, 16,4%) nachgewiesen werden. Sieben Doppelinfektionen, bestehend aus 5 CMV+Parvovirus B19- und 2 EBV+Parvovirus B19-Kombinationen, wurden unter den RA-Fällen (7/29, 24,1% der RA-Fälle) detektiert. Jeweils eine simultane CMV+Parvovirus B19- und eine koinzidente CMV+EBV-Infektion zeigte sich unter den 6 untersuchten PSA-Fällen (2/6, 33,3%). Die Gruppe der rA/S floss mit nur einem Fall einer CMV+ParvoB19-Doppelinfektion (1/26, 3,8%) in die Statistik ein.

Eine relevante, koinzidente Infektion durch alle drei untersuchten Viren (EBV+CMV+Parvovirus B19) (**Tripel-Virus Infektion**) wurde in drei Synovialgeweben beobachtet (3/61, 4,9%). Bei den drei Proben handelte es sich ausschließlich um Vertreter der RA-Gruppe. Unter Betrachtung des Kollektivumfanges korrespondieren diese drei Fälle mit 10,3% aller analysierten RA-Proben.

Die folgende Tabelle veranschaulicht die Ergebnisse der Metaanalyse einer viralen Multiinfektion der arthritischen Synovialgewebe.

Tabelle 15 Isolierte oder koinzidente, relevante Synovialinfektion durch EBV, CMV und/oder Parvovirus B19, differenziert nach verschiedenen Arthritis-Entitäten

Klinische Diagnose	relevante Gesamtanzahl	koinzidente Infektion							
		relevante Virusinfektion*		SVI		DVI		TVI	
RA (n=29)	<b>21</b> 72,4%	<b>11</b> 37,9%	<b>7</b> 24,2%	<b>3</b> 10,3%					
PSA (n= 6)	<b>4</b> 66,7%	<b>2</b> 33,3%	<b>2</b> 33,3%	---	---				
rA/S (n=26)	<b>6</b> 23,1%	<b>5</b> 19,2%	<b>1</b> 3,8%	---	---				
( $\Sigma$ n=61)	<b>31</b> 50,8%	<b>18</b> 29,5%	<b>10</b> 16,4%	<b>3</b> 4,9%					
$\chi^2$ -Test p-Werte	<0,001	0,33	0,084	0,25					

EBV, Epstein-Barr Virus; CMV, Cytomegalievirus; ParvoB19, ParvovirusB19; RA, Rheumatoide Arthritis; PSA, Psoriasis Arthritis; rA/S, reaktive Arthritis/Synovitis; SVI, singuläre Virusinfektion; DVI, Doppel-Virusinfektion; TVI, Tripel-Virusinfektion; ;\*, mindestens eine Virusinfektion. Die p-Werte wurden mittels  $\chi^2$ -Test ermittelt.

Zur Komplettierung der Ergebnisdokumentation zeigt die Tabelle 17 im Anhang eine detaillierte Übersicht über die nachgewiesene Virusinfektion jeder einzelnen Synovialprobe differenziert nach Arthritis-Entität und durchgeführter Virusanalyse. Aus dieser Tabelle lässt sich für jedes individuelle Synovialgewebe der Infektionsstatus ablesen.

Die Auswertung der Metaanalyse hinsichtlich einer simultanen Multivirusinfektion der jeweiligen Arthritis-Probe fand internationales Interesse (Mehraein et al., 2004).

## 5.5 Zusammenfassung der Kernergebnisse

- Relevante Parvovirus B19-, CMV- und EBV- Infektionen konnten in arthritisch veränderten Synovialgeweben nachgewiesen werden.
- Jede der drei analysierten Virusinfektionen war nicht spezifisch für RA, betraf jedoch die RA- und PSA-Gruppe (Autoimmunarthritiden) evident häufiger als die rA/S-Kontrollgruppe.
- Unter den analysierten Viren wurde am häufigsten eine Parvovirus B19-Infektion nachgewiesen; diese Dominanz zeigte sich unter allen drei Arthritis-Entitäten.
- Ein Synoviozyten-Tropismus konnte neben einer lymphozytären Infektion für EBV und CMV nachgewiesen werden, wohingegen Parvovirus B19 ausschließlich in lymphatischen Zellinfiltraten detektiert wurde.
- EBER 1/2-positive Synovialproben zeigten eine ausgeprägte LMP1-Expression als Hinweis auf eine latente EBV-Infektion, wohingegen nur in Einzelfällen ausgeprägter latenter Infektion eine geringe replikative Aktivität nachgewiesen werden konnte.
- In  $\frac{2}{3}$  der CMV-positiven RA- und PSA-Fälle konnte eine lediglich schwache replikative Komponente im Sinne einer lokalen Aktivierung bei überwiegend latenter Infektion detektiert werden.
- Eine relevante koinzidente Doppel- oder Tripelvirus-Infektion konnte fast ausschließlich unter den RA- und PSA-Fällen nachgewiesen werden (in ca.  $\frac{1}{3}$  der PSA- und RA-Fälle). 10 % der RA-Fälle demonstrierten eine relevante Tripelvirusinfektion (EBV, CMV und Parvovirus B19). Lediglich in einem rA/S-Fall wurde eine Doppelinfektion nachgewiesen.

## **6 Diskussion**

Die Beteiligung viraler Infektionen wurde seit langem als exogener Faktor bei der Entstehung der RA vermutet und in vielfältigen Studien mit z.T. kontroversen Ergebnissen analysiert. Aufgrund serologischer Aspekte sowie nachweislicher Proteinhomologien zu zellulären Proteinen wurde zum einen eine Beteiligung von Viren im Sinne einer systemischen, immunologischen Reaktion diskutiert. DNA-Nachweise aus RA-Gelenken wiesen zum anderen auf eine mögliche lokale Infektion der Synovialis hin (Stahl et al., 2000; Saal et al., 1992; Saal et al., 1999; Murayama et al., 1992; Einsele et al., 1992; Sawada et al., 2005; Takei et al., 1997; Takeda et al., 2000). Durch die dargestellten Untersuchungen konnte bei Autoimmunarthritis (RA und PSA) sowohl für Parvovirus B19 als auch für EBV und CMV das Vorliegen relevanter, synovial lokalisierter Virusinfektionen gezeigt werden. Obwohl entsprechende Virusinfektionen hierbei nicht ausschließlich, also spezifisch in Fällen von RA bzw. PSA, auftraten, konnte im Hinblick auf die Häufigkeit und das Ausmaß der viralen Affektion eine z.T. signifikante Diskrepanz zu den rA/S-Kontrollfällen gezeigt werden. Diese Befunde belegen nicht nur eindrücklich das Vorkommen einer lokalen Synovialinfektion, sondern auch die Möglichkeit einer Virus-Ätiologie im Rahmen der RA.

### **6.1 Parvovirus B19**

#### **6.1.1 Parvovirus B19-Infektionsnachweis in verschiedenen Arthritis-Entitäten**

In 65% aller Proben des untersuchten Kollektivs (41/63) wurde eine Parvovirus B19-Infektion innerhalb des Synovialgewebes identifiziert. Eine Parvovirus B19-Infektion war hierbei in RA bzw. PSA nachweisbar, wurde aber auch in rA/S sowie in einem Fall normaler Synovialis beobachtet. Somit zeigte sich der Parvovirus B19-Nachweis nicht spezifisch für eine der Arthritis-Entitäten.

Bemerkenswert war jedoch ein signifikant höherer Anteil Virusprotein-positiver Fälle unter den Immunarthritis, insbesondere unter RA- (89,7%, 26/29), in geringerem

Ausmaß unter PSA-Fällen (66%, 4/6), im Vergleich zur Kontrollgruppe der rA/S (38,5%, 10/26).

Neben einer signifikanten Überrepräsentation virus-positiver Fälle zeigte sich darüber hinaus bei semiquantitativer Analyse ein - gemessen an der Anzahl positiver Zellen - signifikant höheres Ausmaß der Parvovirus B19-Infektion unter den RA- bzw. PSA-Fällen im Vergleich zur rA/S-Kontrollgruppe. Parvovirus B19-positive RA- bzw. PSA-Synovien wurden evident häufiger den Gruppen II und III (mittlere und hohe Anzahl Parvovirus B19-positiver Zellen) zugeordnet (20/26; 76,9% bzw. 2/4; 50%) als der rA/S (3/10; 30%). Hierdurch wurde die beobachtete Diskrepanz des Parvovirus B19-Nachweises zwischen den Arthritis-Entitäten noch eindrücklicher.

Eine unspezifische B19-Arthropathie ist hinlänglich bekannt (Speyer et al., 1998; Reid et al., 1985). Die hier dargestellten Daten belegen weiterhin eine deutliche Assoziation von RA und Parvovirus B19-Infektion im Synovialkompartiment. Diese Ergebnisse sind kohärent mit Ergebnissen früherer PCR-basierter Studien (Stahl et al., 2000; Saal et al., 1992; Murai et al., 1999; Takahashi et al., 1998). Im Gegensatz zu den PCR-Daten konnte die Immunhistochemie, als nicht-amplifizierendes *in situ*-Verfahren, über den qualitativen Nachweis hinaus - durch Quantifizierung - eine tatsächlich relevante Parvovirus B19-Infektion darstellen.

Auch bei rA/S konnten in einem Teil der Fälle - meist schwächer ausgeprägt - Parvovirus B19-Infektionen in der Synovialis gezeigt werden. Eine mögliche Interpretation wäre hierbei zum einen eine generelle, synovial lokalisierte Persistenz von Parvovirus B19, zum anderen könnte die Parvovirus B19-Infektion eine unspezifische Arthritis begünstigen bzw. unterhalten.

Der vergleichsweise starke Parvovirus B19-Nachweis in RA könnte dann u.U. als Progression einer primär unspezifischen Parvovirus B19-positiven-rA/S bei fortschreitender Parvovirus B19-Aktivierung gedeutet werden. Andererseits ist eine unabhängige Beteiligung von Parvovirus B19 sowohl bei rA/S als auch bei RA denkbar.

### **6.1.2 Fragliche Beeinflussung der Parvovirus B19-Ergebnisse durch Diagnose-inhärente Gewebecharakteristika**

Sowohl bei RA als auch bei PSA treten als histologisches Charakteristikum ausgedehnte Infiltrationen, z.T. in follikulärer Gruppierung, sog. Keimzentren, mit T- und B-Lymphozyten (RA) bzw. mit überwiegend T-Lymphozyten (PSA), auf (Imai et al., 1989; Gladman et al., 1988). Im Rahmen reaktiver unspezifischer Arthritiden können je nach Aktivitätsgrad, Dauer sowie Ursache unterschiedlich stark ausgeprägte, lymphozytäre Infiltrate auftreten, die jedoch meist geringer ausgeprägt sind als bei RA und PSA beobachtet. Aufgrund der Identifikation der Parvovirus B19-positiven Zellen im Synovialstroma als Lymphozyten könnten die oben dargelegten Diskrepanzen des Parvovirus B19-Nachweises der Arthritis-Entitäten durch eine unterschiedliche Anzahl infiltrierender Lymphozyten bedingt sein. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass das Ausmaß der chronischen Entzündung alleine für Unterschiede der Parvovirus B19-Expression zwischen den Autoimmun- und den chronisch reaktiven Arthritiden ursächlich ist, wurden in die Kontrollgruppe der rA/S insbesondere Fälle mit histomorphologischen Zeichen ausgeprägter chronischer Veränderungen und Entzündung eingeschlossen. Eine getrennte Analyse dieser Subgruppe zeigte keine signifikante Abweichung vom Gesamtergebnis aller chronisch reaktiven Arthritis/Synovitis-Fälle. Dieses Ergebnis widerspricht der ausgeführten Hypothese eines rein quantitativen Effektes einer Lymphozyteninfiltration.

### **6.1.3 Beteiligung einer RA-typischen bzw. iatrogenen Immundefizienz**

Bei an RA erkrankten Patienten ist eine allgemeine Dysregulation bzw. Störung des Immunsystems bekannt. Auch im Rahmen der antirheumatischen Basistherapie werden üblicherweise immunsuppressive Medikamente eingesetzt. Bei den hier analysierten RA- und PSA-Patienten ist überwiegend von einer RA-Medikation auszugehen. Es wäre somit denkbar, dass eine gestörte Immunantwort (RA-inhärent oder iatrogen) auf exogene Erreger, wie z.B. Viren, eine vermehrte Virusreplikation bzw. Aktivierung einer persistenten, niederschwellig aktiven oder latenten Infektion erlaubt. Die signifikante Überrepräsentation der virus-positiven Fälle unter den Autoimmunarthritiden könnte entsprechend durch eine Störung des Immunsystems verursacht sein. Obwohl die ausgedehnte Virusinfektion dann als sekundäres Phänomen

zu verstehen wäre, würde sie die lokale Inflammationsreaktion unterhalten und einen kofaktoriellen Beitrag zur lokalen Synovitis leisten.

#### **6.1.4 Beteiligung von Parvovirus B19 an der primären RA-Genese**

Gegen eine Virusaktivierung bei primärer Immundefizienz spricht allerdings der besonders hohe Anteil der RA-Proben mit positivem Parvovirus B19-Protein-Nachweis von annähernd 90% verglichen mit einer Seroprävalenz von lediglich 50-70% in der Bevölkerung. Diese bemerkenswerte Diskrepanz lässt sogar eine kausale Beteiligung des Parvovirus an der primären Pathogenese der RA vermuten (Anderson et al., 1986, Cohen et al., 1988).

Besonders interessant im Kontext einer ätiologischen Beteiligung ist ein in dieser Studie analysierter Fall einer 5 Jahre alten Patientin mit RA (Rheumafaktor positiv). Trotz ihres noch jungen Lebensalters und damit kurzer Krankheitsdauer ließ sich in der Synovialis einer primären Läsion bereits in diesem frühen Stadium der generalisierten Erkrankung eine ausgeprägte Parvovirus B19 Infektion nachweisen (Gruppe III; Fall 14).

Unter den Fällen mit „zahlreich virus-positiven Zellen“ (Gruppe III) rekrutiert sich nur ein Probe aus der rA/S-Kontrollgruppe (Fall 46). Der korrespondierende Patient war eine 20 Jahre alte Frau mit isolierten, unilateralen Kniebeschwerden über einen Zeitraum von einem Jahr. Klinisch wurde eine unklare chronische Synovitis oder Verdacht auf Plicasyndrom vermutet. Anhand der histomorphologischen Untersuchung konnte eine RA in diesem Fall jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die Kombination aus starker synovialer Parvovirus B19-Infektion einerseits und die klinisch apparente Symptomatik in vergleichsweise kurzer Zeit andererseits lassen eine primär durch Parvovirus B19 verursachte Arthritis wahrscheinlich erscheinen. Vor allem die zur RA ähnlichen histomorphologischen Befunde lassen an eine durch Parvovirus B19 getriggerte Arthritis denken, die im Verlauf der Zeit noch die klinischen Kriterien für RA entwickeln könnte.

Unter rA/S-Fällen zeigte sich histomorphologisch in drei Fällen (Probe: 46, 36 und 37) ein RA-ähnlicher oder -vergleichbarer Befund. Alle drei Proben waren nicht nur Parvovirus B19-positiv, sondern zeigten zudem die höchste Anzahl virus-positiver Zellen (1x Gruppe III, 2x Gruppe II) innerhalb der rA/S-Gruppe. Folglich könnte

Parvovirus B19 in die Ausbildung zumindest eines histomorphologischen Rheuma-Phänotyps, u.U. aber auch in die primäre RA-Genese involviert sein.

#### **6.1.5 Bedeutung von Parvovirus B19-Protein-Expression im RA-Geschehen**

Die immundominanten Kapsidproteine VP1 und VP2 dienen als spezifische Targets für im Rahmen einer humoralen Immunantwort gebildeten IgG (VP1 und VP2) und IgM (hauptsächlich VP2) (Modrow, 2002). Im Rahmen einer Antikörperbindung kommt es zur Aktivierung von inflammatorischen Faktoren wie z.B. Zytokinen, die selbst als Entzündungsmediatoren fungieren. Unter Annahme einer Immunantwort gegen die exprimierten viralen Proteine im Gelenk weisen die beobachteten Ergebnisse eindeutig auf eine wesentliche Bedeutung einer synovialständigen Parvovirus B19-Infektion am Erhalt bzw. an der Progression einer Rheumatoiden Arthritis sowie der Psoriasis-Arthritis hin. In geringerem Ausmaß ist darüber hinaus eine entsprechende Beteiligung von Parvovirus B19 an anderen Formen chronisch entzündlicher Gelenkerkrankung möglich.

#### **6.1.6 Methodische Aspekte des Parvovirus B19-Proteinnachweises**

Der Nachweis einer Parvovirus B19 Infektion erfolgte über eine immunhistochemische Detektion der zwei Virus-Strukturproteine VP1 und VP2. Da das Parvovirus B 19 nicht zu latenter Infektion fähig ist, sondern nur über eine low-grade Replikation persistieren kann, ist der gewählte Ansatz zur Analyse einer synovialen Parvovirus B19-Persistenz bzw. -Präsenz geeignet. Der alleinige Nachweis viraler Proteine erlaubt primär keinen sicheren Rückschluss auf das Vorliegen einer zellulären Infektion. Dennoch spricht die Intensität des Parvovirus B19-Proteinnachweises, als Hinweis auf eine hohe Proteinkopienzahl, eher für eine intrazelluläre Virusreplikation als für eine Inkorporation zirkulierender Proteine in den virus-positiven Zellen. In verschiedenen Studien wurde bei RA in der Synovialis oder in der Synovialflüssigkeit Parvovirus B19-DNA mittels PCR nachgewiesen (Stahl et al., 2000; Saal et al., 1992; Murai et al., 1999; Takahashi et al., 1998). Diese Befunde werden nun durch den Nachweis von Parvovirus B19-Protein belegt; umgekehrt ist somit auch in unseren Fällen das Vorliegen der viralen DNA als Nachweis eines intakten infektiösen Virus anzunehmen.

### 6.1.7 Charakterisierung der Parvovirus B19-positiven Zellen

Mittels Immundoppelfärbung wurden die Parvovirus B19-positiven Zellen als T- oder B-Lymphozyten identifiziert. Dieser Befund ist insofern bemerkenswert, da eine Parvovirus B19-Infektion und Virus-Replikation bislang nahezu ausschließlich in Erythroblasten bekannt ist (Srivastava et al., 1988). Eine replikative bzw. lytische Infektion des Parvovirus B19 wird in den Vorstufen und Zellen der erythropoiden Reihe über das Erythrozyten P-Antigen vermittelt (Brown et al., 1993). Dieses P-Antigen, auch als Glycolipoid Globosid (Gb4) bezeichnet, liegt idealtypisch auf den roten Vorläuferzellen vor und erklärt den bevorzugten Tropismus des Virus zu diesen Zellen im Knochenmark; in der Infektionskaskade wirkt Gb4 als zielzellulärer Rezeptor (Brown et al., 1993; Cooling et al., 1995). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass dieses Schlüsseloberflächenmolekül nicht auf die Erythroblasten beschränkt ist, sondern in 11 weiteren Geweben überwiegend mesodermalen Ursprungs präsent ist. Weiterhin konnte für das Parvovirus B19-Kapsid die Bindung an eine Reihe gewebespezifischer Glycosphingolipide unterschiedlicher Zielzellen dargestellt werden, darunter Thrombozyten, Granulozyten, Endothelzellen von Lunge, Herz, Leber und Niere sowie insbesondere auch Zellen des Synovialgewebes (Cooling et al., 1995); ferner wurde eine Infektion von T- und B-Lymphozyten demonstriert (Kerr et al., 2000).

Synovialzellen könnten über Globosidrezeptoren als potentielle Targets für das Virus dienen. Eine Infektion eigentlicher Synovialzellen konnte durch die hier dargestellte Untersuchung jedoch nicht belegt werden. Allerdings gibt es Hinweise, dass Synoviozyten, trotz Ausstattung mit dem Globosid (Gb4)-Rezeptor, *in vitro* für das Parvovirus B19 nicht permissiv sind (Miki et al., 1992). Nicht permissive Zellen reagieren auf die B19-Virusinfektion mit einer Transformation und unkontrollierter Vermehrung der Zellen ohne Bildung von Nachkommenviren, das heißt ohne Bildung großer Menge von Strukturproteinen. Eine entsprechende *in vivo*-Situation in B19-infizierten Synoviozyten wäre somit durch den eingesetzten B19-Kapsid-Proteinnachweis nicht sicher darstellbar.

Die erfasste Parvovirus B19-Infektion in Zellen der lymphatischen Reihe kann über die Beteiligung o.g. verwandter Rezeptorstrukturen erklärt werden. In Anlehnung an den Infektionsmechanismus der erythropoiden Reihe sind bei fehlendem P-Antigen auf den Lymphozyten differente, zelluläre Rezeptoren zu vermuten, die eine Adhäsion sowie

konsekutive Penetration mediiieren. Der intralymphozytäre Nachweis von Parvovirus B19-Kapsidproteinen im Synovialgewebe weist nicht nur auf die intrazelluläre Virusreplikation hin, sondern liefert einen weiteren Beleg einen auf die erythropeide Reihe begrenzten Tropismus zu verlassen.

#### **6.1.8 Fragliche Parvovirus B19-Persistenz auch in normalem Synovialgewebe**

Nebenbefundlich zeigte eines der beiden normalen Synovialgewebe vereinzelt isolierte Parvovirus B19-positive Zellen (Gruppe I/II). Die Beobachtung lässt sich in unterschiedlicher Weise deuten. Zum einen könnte generell nach stattgehabter systemischer Parvovirus B19-Infektion in normalem Synovialgewebe eine lymphozytenständige Persistenz von Parvovirus B19 vorkommen. Basierend auf veröffentlichten PCR-DNA-Daten wurde eine Parvovirus B19-Expression auch in einem unveränderten Synovialgewebe vermutet (Söderlund et al., 1997; Hokynar et al., 2000).

Zum anderen ist eine histologisch nicht erfassbare Affektion bzw. Traumatisierung der „normalen“ Synovialis bei den durch Operation entnommenen Synovialproben nicht mit Sicherheit ausgeschlossen. In dem hier erfassten Fall Parvovirus B19-positiver „normaler“ Synovialis (Fall 63) verneinte die 23-jährige Patientin arthritische Beschwerden, berichtete über eine traumatische Sportverletzung des Gelenkes. Eine chronische subklinische Irritation der Synovialis könnte in diesem Fall daher möglich sein.

Eine Persistenz des Parvovirus B19 ist für das Kompartiment Knochenmark nachgewiesen (Kurtzmann et al., 1987; Lundquist et al., 1999) und einige Befunde weisen auf einen identischen Status im Synovialgewebe hin (Söderlund et al., 1997; Cassinotti et al., 1998).

Eine repräsentative Anzahl normaler Synovialkontrollen zur Klärung einer Virus-Prävalenz in Normalgewebe konnte in der vorgestellten Arbeit leider nicht analysiert werden. Hierzu sind weitere Studien erforderlich.

## **6.2 Cytomegalievirus**

### **6.2.1 Nachweis synovialer CMV-Präsenz in arthritischem Gewebe mit Überrepräsentation in der RA-Gruppe**

Mittels *in situ*-Hybridisierung, unter Verwendung von CMV-DNA-Sonden, wurde in 24,6% (15/61) aller Arthritisproben, ungeachtet der Arthritis-Entität, eine CMV-Infektion nachgewiesen (23,8% bezogen auf das Gesamtkollektiv von 63 Synovialis-Proben einschließlich der Normalfälle).

In beiden analysierten Normalfällen mit unveränderter Synovialis wurde eine CMV-Infektion ausgeschlossen. Literaturdaten bezüglich der Prävalenz einer CMV-Infektion in gesundem Synovialgewebe liegen bisher nicht vor. Aus den eigenen Daten lassen sich hierzu aufgrund der Einzelfallbeschreibung ebenfalls keine allgemeinen Aussagen ableiten. Aus diesem Grunde ist nicht zu entscheiden, ob die beobachtete persistierende, synoviale CMV-Infektion generell mit arthritischer Symptomatik assoziiert ist.

Bei Analyse der CMV-positiven Arthritis-Fälle nach Diagnosegruppen ließ sich eine exklusive Limitierung auf das RA-Kollektiv nicht beweisen. Dennoch zeigte sich eine signifikante Ungleichverteilung zugunsten der Autoimmunarthritiden mit CMV-Nachweis in einem Drittel bzw. der Hälfte der RA- bzw. PSA-Fälle, hingegen nur in ca. 10% der rA/S-Gruppe. Der 3- (bis 5-) fach höhere Anteil unter Autoimmunarthritiden im Vergleich zum Kontrollkollektiv bekräftigt als signifikante Diskrepanz den Verdacht einer Assoziation zwischen einer lokalen CMV-Infektion und der RA-Genese.

### **6.2.2 Methodische Aspekte der eingesetzten *in situ*-Analyseverfahren; Beurteilung einer relevanten synovialen Infektion durch quantitative Analyse und Charakterisierung des CMV-infizierten Zelltyps**

Bis dato publizierte Daten bzgl. einer lokalen, synovialen CMV-Infektion im Rahmen der RA basieren ausschließlich auf PCR-Studien und serologischen Daten wie z.B. Immunglobulin-Titern in der Synovia (Murayama et al., 1992; Einsele et al., 1992; Stahl et al., 2000; Tamm et al., 1993). Hierbei war jedoch methodisch bedingt keine Differenzierung zwischen einer tatsächlichen, relevanten Infektion des Synovialgewebes und einer Immigration virus-tragender Immunzellen im Rahmen

rheumatischer Lymphozyten-Infiltration möglich. Aufgrund des Einsatzes nicht amplifizierender *in situ*-Nachweisverfahren (*in situ*-Hybridisierung versus PCR) konnten wir nun anhand histo-zytomorphologischer Information eine klare Zuordnung CMV-positiver Zellen unter quantitativer Beurteilung der originären Viruslast erbringen. In allen CMV-positiven Fällen erfolgte eine Virusdetektion sowohl in infiltrierenden Lymphozyten als auch in eigentlichem Synovialgewebe insbesondere im Bereich der synovialen Deckzellschicht (synovial lining cells). Es konnte somit erstmalig ein direkter Nachweis einer CMV-Infektion von Synovial lining-Zellen und vereinzelt stromalen Synovial-Fibroblasten erbracht werden. Unter quantitativer Betrachtung konnte eine ausgeprägte lokale Viruspräsenz als Hinweis auf eine relevante regionale Infektion dargestellt werden. Zusammengenommen belegen diese Befunde die These einer relevanten CMV-Affektion auch des eigentlichen Synovialgewebes; eine alleinige Einschleusung von CMV-Genom durch Infiltratzellen konnte widerlegt werden.

### **6.2.3 Beleg der Virusgenom-Integrität und der Potenz zur Replikation**

Aus dem synovialen Nachweis viraler CMV-DNA via PCR konnte bisher nicht auf die Präsenz infektiöser Viren, d.h. auf die Vollständigkeit des viralen Genoms und auf die Potenz bzw. Status einer viralen Replikation, geschlossen werden.

Der in dieser Arbeit dargestellte, teilweise ausgedehnte Befall der ortsständigen Synovial-Deckzellschicht lässt eine regionale Virusinfektion und -replikation und somit die Vollständigkeit des CMV-Genoms vermuten. Zur Evaluierung des Aktivitätsstatus erfolgte die immunhistochemische Analyse auf das CMV-early Antigen (EA), dessen Synthese im lytischen bzw. replizierenden Virusstadium erfolgt. Dieses lytische-Phase-Protein wurde in  $\frac{2}{3}$  der CMV-DNA-positiven RA- (6/9) sowie PSA-Fälle (2/3) nachgewiesen. Grundsätzlich ist der Nachweis von EA ein weiterer Beleg für das Vorliegen eines intakten CMV-Genoms mit Potenz zur Virus-Replikation und Infektion im arthritischen Synovialgewebe.

### **6.2.4 Bestimmung und Beurteilung der viralen Aktivität (Infektionszyklus)**

In Korrelation zu den CMV-DNA-positiven Zellen (CMV-DNA-ISH) war die EA-Expression lediglich als gering bis mäßig zu quantifizieren und auf wenige Zellen

beschränkt, was am ehesten mit einer überwiegend latenten Infektion mit lokal-limitierter Reaktivierung vereinbar ist.

Wie auch für andere Viren der Herpesvirus-Familie ist auch für CMV die Befähigung in unterschiedlichen Geweben zu persistieren bekannt. (Modrow et al., 2003). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dokumentieren explizit eine latente Persistenz von CMV in der Synovialmembran. Dieser Aspekt ist in Hinblick auf die Ursache der auffällig erhöhten Rate CMV-positiver Fälle unter den Autoimmunarthritiden interessant. Unter Annahme einer Störung des Immunsystems im Rahmen der RA bzw. RA-Therapie wäre eine erhöhte Infektanfälligkeit der Patienten auch gegenüber viralen Agenzien denkbar. Hierbei wäre in erster Linie das Neuaufreten lytischer Infektionen bzw. eine Reaktivierung latenter Infektionen zu erwarten (Vancikova et al., 2001). Das vermehrte Auftreten latenter Infektionen - die eine immunologische Kontrolle zeigen - wäre hierfür eher untypisch.

Der regionale Nachweis von EA bei überwiegend latenter CMV-Infektion könnte allerdings eine CMV-Reaktivierung im Rahmen der immunsuppressiven Therapie widerspiegeln (Vancikova et al., 2001). Andererseits ist eine CMV-Aktivierung durch Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen im Rahmen der Synovialitis als Ursache des replikativen Status denkbar.

### **6.2.5 Mögliche Bedeutung einer persistierenden CMV-Infektion der Synovialis; Interaktion mit zellulären Mechanismen**

Ein charakteristischer Effekt der CMV-Infektion ist die Steigerung der zellulären Syntheseleistung mit der Hochregulation einer Vielzahl zellulärer Proteine, unter diesen auch Transkriptionsfaktoren und DNA-replizierende Enzyme (Yurochko et al., 1995; Johnson et al., 2001). Für einige CMV-kodierte Proteine konnte eine direkte Apoptose-inhibierende Wirkung gezeigt werden (Zhu et al., 1995; Goldmacher et al. 1999). Ferner verstärkt eine CMV-Infektion die transaktivierende Funktion von NF-kappaB mit konsekutiver Aktivierung von Genen, die ebenfalls an der Apoptose-Inhibierung beteiligt sind (Yurochko et al., 1995). Die zellulären Interaktionen im Rahmen einer latenten CMV-Infektion sind bislang allerdings nur zum Teil analysiert und noch unvollständig verstanden. Generell könnten die molekularen Mechanismen der CMV-Infektion über eine konsekutive zelluläre Dysregulation in der Summe eine Gewebe-

Proliferation bedingen. In diesem Kontext wurde kürzlich die Persistenz des humanen CMV in verschiedenen Tumoren beobachtet und eine mögliche kausale Assoziation diskutiert (Harkins et al., 2002; Samanta et al., 2003). Bezogen auf die in RA charakteristische tumorähnliche Proliferationstendenz der Synovialis ist es in Analogie denkbar, dass eine latente bzw. persistierende synoviale CMV-Infektion an der aggressiven rheumatischen Synovialwucherung bzw. Pannusbildung kausal beteiligt ist.

#### **6.2.6 Antigenstimulus durch Expression viraler Proteine**

In einem Drittel der CMV-positiven Synovialgewebe wurde eine Virusreplikation (Viruspartikelbildung) anhand von CMV-EA nachgewiesen. Die Bildung von CMV-Viruspartikeln geht einher mit der Synthese viraler Proteine mit antigenem Potenzial (Modrow et al., 2003). Unabhängig von einer möglichen ursächlichen Beteiligung von CMV bei der RA kann die Expression antigener Proteine im Synovialgewebe über Mechanismen der Immunabwehr zu lokal-entzündlichen Vorgängen und somit kofaktoriell zur Entstehung bzw. Unterhalt der Synovitis beitragen.

Zusammenfassend bestärken die dargestellten Befunde die Möglichkeit einer kausativen oder kofaktoriell begleitenden Rolle der CMV-Infektion in der Entwicklung bzw. im Verlauf der Autoimmunarthritis.

## 6.3 Epstein-Barr Virus

### 6.3.1 EBER-Nachweis in der RA/PSA-Gruppe versus rA/S-Kontrollgruppe

Die EBER-*in situ*-Hybridisierung gilt auf dem Gebiet der molekularen Diagnostik als Goldstandard zum Nachweis und zur Lokalisierung einer Epstein-Barr Virus-Infektion (Gulley et al., 2001; Ambinder et al., 1994). Die abundante Produktion dieser nicht translatierten EBV-encoded small RNAs (EBER 1/2) ist charakteristisch, aber nicht spezifisch für eine latente EBV-Infektion, da sie auch im Stadium der lytischen Replikation nachweisbar ist.

Via EBER-RNA-Nachweis wurden EBV-infizierte Zellen in 37,7% der 61 Arthritis-Proben identifiziert. EBV-positive Fälle wurden hierbei mit ca. der Hälfte der RA- (48,2%) sowie der PSA-Proben (3/6; 50%) im Vergleich zu 23% der reaktiven Arthritiden im Kontrollkollektiv deutlich häufiger unter den Autoimmunarthritiden beobachtet. Eine exklusive Limitierung des EBER-Nachweises auf die Autoimmunarthritiden-Fälle war allerdings nicht zu dokumentieren.

Die differenzierte Betrachtung der EBV-positiven Fälle hinsichtlich Zelltropismus und Ausmaß der Viruslast mündete in eine Klassifikation von Fällen mit ausgeprägter „relevanter“ Infektion und von Fällen mit locker gestreuten positiven Zellen, welche mit der Immigration EBV-positiver B-Reservoirzellen vereinbar sind. Auch unter Letzteren zeigten die Autoimmunarthritiden einen relativ höheren Anteil.

Die Prävalenz einer Seropositivität beträgt 95% in der erwachsenen Bevölkerung und geht mit einer lebenslangen Persistenz latent-infizierter Zellen der B-Reihe als Virus-Reservoir einher (Modrow, 2003; Bornkamm, 2001). Sowohl die Rheumatoide Arthritis als auch die Psoriasis Arthritis sind durch eine synoviale Infiltration von B- und T-Lymphozyten (RA) bzw. überwiegend T-Lymphozyten (PSA) charakterisiert. (Imai et al., 1989; van Kuijk et al, 2006). Unter diesem Aspekt erscheint das Überwiegen von Autoimmunarthritiden, insbesondere der RA, bei einzellig EBER-positiven Fällen als Folge der krankheitstypischen ausgeprägten Lymphozyteninfiltration möglich. Grundsätzlich ist hier aber auch ein allgemein erhöhter Anteil latent EBV-positiver B-Zellen im Organismus denkbar. Aus der Literatur ist bekannt, dass bei Patienten mit RA eine reduzierte EBV-Immunabwehr mit geringerer Viruslimitierung vorliegt

(Balandraud et al., 2004; Ollier et al., 2000; Tosato et al., 1981; Tosato et al., 1984; Sawada et al., 2005; Costenbader et al., 2006).

Eine „relevante“ EBV-Infektion, definiert durch die Beteiligung von Synovia lining-Zellen bzw. synovialen Stromazellen oder durch eine ausgeprägte Infiltration EBV-positiver Lymphozyten, wurde in 11,5% (7/61) nachgewiesen. Mit 85% (6/7) überwiegen in dieser Gruppe deutlich Fälle mit RA (5/7) und PSA (1/7). Eine relevante EBV-Infektion wurde in 20% bzw. 16% der RA- bzw. PSA- sowie in 3,8% der rA/S-Fälle nachgewiesen. Es konnte somit dargestellt werden, dass eine lokale EBV-Infektion der Synovialis in einem Teil der Autoimmunarthritis - zwar nicht ausschließlich, jedoch weit häufiger als in unspezifischen Arthritis - vorkommt. Eine Rolle der synovialen EBV-Infektion als exogenes Pathogen im Rahmen der RA wird hierdurch bekräftigt.

Diese Befunde bestätigen verschiedene Arbeiten (Saal et al., 1999; Stahl et al., 2000; Takeda et al., 2000; Zhang et al., 1993; Edinger et al., 1999), die einen Nachweis von EBV in Synovial-Flüssigkeit bzw. -Gewebe von RA-Patienten berichten. Andere Studien konnten das Vorliegen synovialer EBV-Infektionen bei RA-Patienten nicht belegen (Niedobitek et al., 2000; Blaschke et al., 2001; Brousset et al., 1993). In Anbetracht der meist relativ kleinen Studienkollektive sowie des relativ geringen Anteils (maximal 20%) relevanter EBV-Infektionen unter Autoimmunarthritis ist diese Diskrepanz ggf. durch einen Bias bei kleinem Studienumfang erklärbar.

Nur eine Osteoarthritis-Probe (rA/S) bei Coxarthrose unbekannter Ursache und Z.n. TEP-Implantation zeigte eine relevante synoviale EBV-Infektion vergleichbar mit den relevanten Infektionen unter den RA- und PSA-Fällen, allerdings mit einer vergleichsweise größeren Selektivität für Synovial lining-Zellen. Obwohl eine klare Kausalität nicht beurteilbar ist, weist dieser Befund darauf hin, dass eine synoviale EBV-Infektion in seltenen Fällen u.U. für eine nichtspezifische chronische Arthritis verantwortlich sein kann.

Zusammenfassend war eine EBV-Infektion im synovialen Gelenkkompartiment insbesondere bei RA nachweisbar. Betrachtet man die relevante EBV-Infektionsquote von 17,2% innerhalb der RA-Gruppe bestätigt sich, dass eine synoviale EBV-Infektion als unifaktorielle Ursache der RA ausscheidet.

### **6.3.2 EBV-Infektion von Synovia lining-Zellen und Synovialfibroblasten**

Bei histo-zytomorphologischer Analyse fanden sich nicht nur EBV-positive Lymphozyten sondern auch - als wesentlicher Befund - eigentliche EBV-positive Synovialzellen. Die Beobachtung, dass neben Lymphozyten auch Synovial lining-Zellen Angriffsziele der EBV-Infektion darstellen, ist konsistent mit wenigen Literaturberichten (Takeda et al., 2000; Takei et al., 1997).

Interessanterweise fehlt den Synovial lining-Zellen eine CD21-Molekül-Expression, über die charakteristischerweise rezeptormediiert eine EBV-Infektion abläuft. An ebenfalls CD21-negativen humanen Epithelzellen wurde in vitro ein Mechanismus der EBV-Infektion bzw. Ausbreitung über cell-to-cell Kontakt nachgewiesen (Imai et al., 1998). Unsere Beobachtungen wären durch einen ähnlichen Mechanismus, d.h. durch eine Infektion der Synovialzellen durch direkten Zell-Kontakt mit virus-positiven Zellen, zu verstehen.

### **6.3.3 „Virale Aktivität“ bzw. Infektionszyklus der beobachteten synovialen EBV-Infektionen**

Zur Evaluierung des Aktivitätsgrades (Infektionszyklus) der EBV-Infektion wurden die mittels EBER-ISH EBV-positiv getesteten Fälle auf das latente Membranprotein LMP1 bzw. das lytische Phase-Protein BZLF1 (Synonym: ZEBRA Antigen) untersucht. Alle EBER-positiven Proben zeigten eine LMP1-Expression in zum EBER-Nachweis vergleichbaren Zellen und in korrespondierenden Lokalisationen. Somit konnte in allen EBER-positiven Synovialgeweben das Vorliegen einer latenten EBV-Infektion gezeigt werden.

Da auch eine kausale bzw. kofaktorielle Beteiligung der lytischen EBV-Infektionen im Pathomechanismus der RA postuliert wurde (Takeda et al., 2000), erfolgte zur Evaluierung einer replikativen Komponente eine Analyse auf das BZLF1-Protein. Lediglich in drei Fällen des Gesamtkollektivs (3/61) war eine geringe, auf wenige Zellen beschränkte BZLF1-Expression und damit eine lytische Infektion nachweisbar. Alle drei Fälle entstammten der Gruppe der „relevanten“ EBV-Infektionen und zeigten gegenüber einzelnen BZLF1-positiven Zellen eine weitaus überwiegende LMP1-Expression. Auch in diesen Fällen ist daher von einer überwiegend latenten Infektion mit zu vernachlässigender lytischer Komponente auszugehen.

Bei gestörter bzw. geschwächter Immunitätslage ist eine lokale Reaktivierung einer ausgedehnten latenten EBV-Infektion möglich, wie Sie auch für CMV diskutiert wurde.

Vielleicht überlastet eine ausgeprägte latente EBV-Infektion im Gelenkkompartiment die Abwehrmechanismen dahingehend, dass vereinzelt der Übertritt der Viren in einen replikativen Infektionszyklus nicht inhibiert werden kann. In diesem Falle handelte es sich also a.e. um einen quantitativen Effekt.

Die komplettierende Analyse der sieben Arthritisproben mit „relevanter“ EBV-Infektion im Hinblick auf eine Expression von EBNA1, einem weiteren Latenzphase-Markerprotein, bestätigte sowohl das Ausmaß als auch die Lokalisation der latenten EBV-Infektion mit EBNA1-positiven Zellen in der Synoviozytengrenzschicht sowie im Stroma.

#### **6.3.4 Der LMP1-Nachweis / Methodische Aspekte**

Obwohl die EBER-*in situ*-Hybridisierung als das sensitivste Verfahren zum Nachweis einer EBV-Infektion angesehen wird (Niedobitek et al., 2001), wurden mittels LMP1-IHC, insbesondere unter den Proben mit relevanter Infektion, interessanterweise quantitativ mehr EBV-positive Zellen detektiert. Sowohl die latente Infektion von Synovial lining-Zellen als auch die ausgedehnte Infiltration EBV-positiver Lymphozyten mit z.T. follikulärer Organisation wurden bestätigt.

Eine geringere Sensitivität der EBER-ISH könnte grundsätzlich auf methodisch bedingte Verluste der RNA-*in situ*-Hybridisierung zurückzuführen sein. Die Arbeit mit RNA ist mit der Gefahr einer RNase-Kontamination und konsekutiver Sonden- bzw. Targetdegeneration assoziiert. Diese Überlegung erscheint zum einen durch das Faktum einer hohen EBER-Kopienanzahl von bis zu  $10^7$  pro Wirtszelle und zum anderen durch einen bewiesenen, hochsensitiven EBER-Nachweis in den Positivkontrollen unwahrscheinlich. Es ist zu überlegen, ob eine synoviale EBV-Infektion im Rahmen der Autoimmunarthritis mit einer besonders hohen LMP1-Expression einhergeht. Eine mögliche Bedeutung ist bislang unklar.

### 6.3.5 Mögliche Bedeutung von latenter EBV-Infektion bzw. LMP1-Expression

Für das virale LMP1-Protein ist ein onkogenes und transformierendes Potenzial bekannt. Aufgrund seiner Proteinstruktur, Integration in die Plasmazellmembran und seiner biochemischen Eigenschaften fungiert das LMP1 einerseits wahrscheinlich als aktivierter Wachstumsfaktorrezeptor oder reguliert einen solchen aktivierend (Middleton et al., 1991). Andererseits spielt LMP1 vermutlich eine essentielle Rolle beim Prozess der B-Lymphozyten-Immortalisierung (Kilger et al., 1998). Das Virusprotein imitiert hierbei wahrscheinlich einen CD40-Rezeptor mit ligandenunabhängiger Aktivität. Er bindet Tumornekrosefaktor-Alpha (TNF $\alpha$ )-Rezeptor assoziierte Faktoren (TRAFs), aktiviert NF-kappaB und triggert den Transkriptionsfaktor AP-1 über die c-Jun-N-terminal-Kinase (JNK)-Kaskade (Kilger et al., 1998).

Auch *in vitro* konnten die onkogenen bzw. transformierenden Eigenschaften des Virusproteins dokumentiert werden (Wagner et al., 1985; Kulwichit et al., 1998). Als Zeichen der onkogenen Potenz wurden hierbei Veränderungen sowohl der Zellproliferation als auch der Zellmorphologie mit Induktion von Adhäsionsmolekülen (LFA-1, LFA3, ICAM) beschrieben (Wang et al., 1990). Ferner hat LMP1 einen Effekt auf die Expression des Protoonkogens BCL-2 und damit konsekutiv auf die Induktion der BCL-2 vermittelten Apoptose-Suppression (Henderson et al., 1991).

Diese Potenz des EBV eine Zellproliferation bzw. Zelltransformation zu induzieren ist im Rahmen der Rheumatoiden Arthritis äußerst interessant, teilen doch die charakteristischen, histomorphologischen Veränderungen der Synovia bei RA einige Übereinstimmungen mit malignem Tumorgewebe. Beide Konditionen sind sowohl durch dysreguliertes Zellwachstum als auch durch Infiltration mit Destruktion des Nachbargewebes gekennzeichnet (Williams et al., 1986).

Eine relevante EBV-Infektion mit hoher LMP1-Expression wurde in 17,2% der RA- sowie 16,7% der PSA-Fälle nachgewiesen und damit fünfmal häufiger als in der Kontrollgruppe. Somit könnte zumindest für einen Teil der Autoimmunarthritis die LMP1-Expression primär für die proliferative Transformation des Synovialgewebes verantwortlich sein. Als latentes Phase-Protein (LMP1) ist dieser mögliche Pathomechanismus unabhängig von einer floriden, d.h. replizierenden EBV-Infektion.

### **6.3.6 Grundsätzliche Einflussmöglichkeiten von EBV bei der RA**

Über die Effekte von LMP1 (bzw. anderen Latent-Phase-Proteinen) könnte eine latente EBV-Infektion möglicherweise die RA-spezifische Transformation und Proliferation der Synovialis induzieren.

LMP1 ist ein immunogenes Virus-Protein. Als solches ist bei z.T. massiver Expression in Fällen mit relevanter EBV-Synovialinfektion eine immunologische Abwehrreaktion mit konsekutiver Freisetzung von Zytokinen und Aktivierung der Entzündungsreaktion im Gelenk zu erwarten.

Unter Berücksichtigung der molekularen Mimikry-Hypothese kann eine systemische EBV Infektion, neben der direkten Wirkung einer synovialen EBV Infektion, über die Initiierung einer Autoimmunreaktion an der Pathogenese der RA beitragen (Albani et al., 1996; Ollier et al., 2000).

Insbesondere eine mögliche komplexe Kombination dieser verschiedenen EBV-abhängigen pathogenetischen Mechanismen nährt die Vorstellung, dass eine Epstein-Barr Virus-Infektion in der Entwicklung und im Verlauf der Rheumatoiden Arthritis eine wichtige Rolle spielt.

## **6.4 Zusammenfassung und Metaanalyse einer koinzidenten Multivirusinfektion**

Als Interpretation der Parvovirus B19-, der CMV- und der EBV-Daten zeigt sich, dass jedes der drei Viren weitaus häufiger in Synovialis-Proben mit der Diagnose einer RA oder einer PSA als in Proben der Kontrollgruppe mit einer rA/S nachweisbar war.

Verglichen mit der hohen Nachweisrate einer relevanten Parvovirus B19-Infektion von 69% unter den RA-Fällen (unter den PSA Fällen 33%, 2/6) erscheinen relevante CMV- und EBV-Infektionen arthritischer Synovien in einem deutlich geringeren prozentualen Anteil von 31% bzw. 17,2% der RA-Proben (50% bzw. 16,7% der PSA-Fälle).

Obwohl zahlenmäßig unterrepräsentiert, kommt der synovialen EBV- und CMV-Infektion eine besondere Bedeutung zu. In den durchgeführten Studien konnte dokumentiert werden, dass das Epstein-Barr Virus und das Cytomegalievirus befähigt sind, neben Lymphozyten auch primär synoviale Zellen, d.h. sowohl Synovial lining-Zellen als auch stromale Fibroblasten zu infizieren. Parvovirus B19 hingegen war ausschließlich in infiltrierenden Lymphozyten nachweisbar.

### **6.4.1 Koinzidente Mehrfachinfektionen**

PCR-Untersuchungen der Arbeitsgruppe Stahl lieferten den koinzidenten Nachweis verschiedener Viren-DNA, insbesondere der Herpesfamilie und des Parvovirus B19 im Synovialkompartiment (Stahl et al., 2000).

Eine Metaanalyse der in unseren Untersuchungen erhobenen EBV-, CMV- und Parvovirus B19-Daten lieferte in gleichem Sinne den Nachweis von relevanten simultanen Zwei- bzw. sogar Dreifach-Virusinfektionen in einzelnen Proben. Überwiegend wurden isolierte Synovialinfektionen durch jeweils nur eines der analysierten Viren nachgewiesen (in 29% der Arthritis-Fälle; 38% der RA- bzw. 19% der rA/S-Fälle). Dennoch konnte in einem nicht unbeträchtlichen Anteil von 16% der Arthritis-Synovien eine Zweifachinfektion dokumentiert werden; hierbei waren Autoimmunarthritidfälle deutlich häufiger betroffen (24% der RA bzw. 33% der PSA); in rA/S wurde lediglich in einem Fall (3,8%) eine Zweifachinfektion nachgewiesen. Eine relevante Tripel-Infektion mit CMV, EBV und Parvovirus B19 wurde nur in 3 RA-Fällen, entsprechend einem Anteil von 10,3% der RA-Fälle (3/29), beobachtet.

Zusammenfassend ergab die kombinierte Betrachtung der Virusinfektionen, dass das Auftreten von Zwei- bzw. Mehrfachinfektionen nahezu ausschließlich auf Autoimmunarthritisiden bzw. auf RA beschränkt war. Eine kausale Bedeutung von Virusinfektionen im Rahmen der RA-Genese wäre somit u.U. erst über eine additive Wirkung mehrerer Infektionen denkbar (siehe unten).

#### **6.4.2 Effekte kombinierter Virusinfektionen**

Die möglichen Mechanismen, über welche die drei untersuchten Viren die Pathogenese bzw. den Verlauf der Autoimmunarthritisiden beeinflussen können, scheinen unterschiedlich zu sein (siehe Diskussion zu Parvovirus B19, CMV und EBV).

Auf der einen Seite spielen vermutlich Effekte einer durch virale Antigene getriggerten Immunantwort im Synovialgewebe eine Rolle (Roudier et al., 1988 und 1989; Alspaugh et al. 1978 und 1981; Costenbader et al., 2006). Auf der anderen Seite kann die lokale Virusinfektion ortständiger Synovialzellen neben einer Inflammation, Veränderungen in der zellulären Genexpression sowie im proliferativen Verhalten verursachen.

Die Immunantwort gegen immundominante virale Bestandteile oder Produkte könnte über die Freisetzung von Zytokinen eine chronische Entzündung primär auslösen oder sekundär verstärkend modulieren.

Die Dysregulation der zellulären Genexpression mit konsekutiver Proliferation und Apoptose-Inhibierung wurde bereits im EBV- und CMV-Kapitel angedacht.

Neben dem individuellen Effekt der jeweiligen Virusinfektion könnte eine Multivirusinfektion in einer additiven oder potenzierenden Weise im Sinne eines Schwellenmodells im Pathomechanismus der Arthritis wirken.

Serologische Untersuchungen bzgl. CMV und EBV zur Risikostratifizierung an einer Autoimmunarthritis zu erkranken haben dementsprechend gezeigt, dass sich das Gesamtrisiko nicht aus dem jeweiligen Einzelrisiko bei positivem Antikörpernachweis summiert, sondern bei Koinzidenz exponentiell wächst.

### 6.4.3 Generelle Aspekte von Virusinfektionen bei Immunsuppression

Eine immunsuppressive Therapie gehört zu den Eckpfeilern der Therapie bei RA und PSA. Auch an unserem Kollektiv kann der mögliche Einfluss einer Immunsuppression auf den viralen Infektionsstatus der einzelnen Proben nicht ausgeschlossen werden. Die dokumentierte, erhöhte Prävalenz persistierender bzw. **latenter** Synovialinfektionen durch EBV und CMV weist eher auf einen primären Effekt dieser Viren in der Entwicklung einer Autoimmunarthritis hin. Im Rahmen einer Immunsuppression würde eher ein Zusammenbrechen der Toleranz und damit ein Übertritt in eine floride, replizierende Infektion statt eine Repression im Latenzstadium erwartet werden. Ferner ist im Stadium der Immunsuppression die Limitierung auf das Synovialkompartiment unwahrscheinlich. Eher ist eine systemische Ausbreitung mit Beteiligung klassischer Organsysteme zu vermuten, was bei den untersuchten Patienten nicht als solches berichtet wurde.

## 7 Literaturverzeichnis

### A

- 1 Aeschlimann AG, Rheumatoide Arthritis (1998) Orthopäde 27:160-167
- 2 Aho K, Heliövaara M. (2004) Risk factors for rheumatoid arthritis. Ann Med. 36:242-51. Review.
- 3 Ager EA, Chin TD, Poland JD. (1966) Epidemic erythema infectiosum. N Engl J Med. 1966 Dec 15;275(24):1326-31
- 4 Albani S, Carson DA (1996) A multistep molecular mimicry hypothesis for the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Immunol Today 17:466-470
- 5 Alspaugh MA, Talal N, Tan EM. (1976) Differentiation and characterization of autoantibodies and their antigens in Sjogren's syndrome. Arthritis Rheum. 19:216-22.
- 6 Alspaugh MA, Jensen FC, Rabin H, Tan EM. (1978) Lymphocytes transformed by Epstein-Barr virus. Induction of nuclear antigen reactive with antibody in rheumatoid arthritis, J Exp Med.147:1018-27
- 7 Alspaugh MA, Henle G, Lennette ET, Henle W. (1981) Elevated levels of antibodies to Epstein-Barr virus antigens in sera and synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. J Clin Invest. 67:1134-40
- 8 Allday MJ, Crawford DH, Thomas JA. (1993) Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 6 induces expression of the EBV latent membrane protein and an activated phenotype in Raji cells. J Gen Virol. 74 :361-9
- 9 Ambinder RF, Mann RB: (1994) Epstein-Barr-encoded RNA in situ hybridization: diagnostic applications. Hum Pathol. 25:602-605
- 10 Anderson LJ, Tsou C, Parker RA, Chorba TL, Wulff H, Tattersall P, Mortimer PP. (1986) Detection of antibodies and antigens of human parvovirus B19 by enzyme-linked immunosorbent assay.J Clin Microbiol. 24:522-6.
- 11 Anderson MJ, Jones SE, Fisher-Hoch SP, Lewis E, Hall SM, Bartlett CL, Cohen BJ, Mortimer PP, Pereira MS. (1983) Human parvovirus, the cause of erythema infectiosum (fifth disease)? Lancet. 1:1378.
- 12 Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al. (1988) The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 31:315-24.

**B**

- 13 Balandraud N, Roudier J, Roudier C. (2004) Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 23:362-7. Review
- 14 Billings PB, Hoch SO, White PJ, Carson DA, Vaughan JH. (1983) Antibodies to the Epstein-Barr virus nuclear antigen and to rheumatoid arthritis nuclear antigen identify the same polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80:7104-8.
- 15 Blaschke S, Schwarz G, Moneke D, Binder L, Muller G, Reuss-Borst M. (2000) Epstein-Barr virus infection in peripheral blood mononuclear cells, synovial fluid cells, and synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 27:866-73.
- 16 Bornkamm GW, Hammerschmidt W. (2001) Molecular virology of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 356: 437-459
- 17 Branch DW. (1992) Physiologic adaptations of pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 28:120-2. Review.
- 18 Bromley M, Woolley DE (1984) Histopathology of the rheumatoid lesion. Identification of cell types at sites of cartilage erosion. *Arthritis Rheum.* 27:857-63
- 19 Brousset P, Caulier M, Cantagrel A, Dromer C, Mazieres B, Delsol G. (1993) Absence of Epstein-Barr virus carrying cells in synovial membranes and subcutaneous nodules of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 52:608-9.
- 20 Brown KE, Anderson SM, Young NS. (1993) Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus, 262:114-7.
- 21 Burmester GR, Dimitriu-Bona A, Waters SJ, Winchester RJ. (1983) Identification of three major synovial lining cell populations by monoclonal antibodies directed to Ia antigens and antigens associated with monocytes/macrophages and fibroblasts. *Scand J Immunol.* 17:69-82.

**C**

- 22 Capriotti T (2004) The 'alphabet' of rheumatoid arthritis treatment *Medsurg Nurs* 13:420-428
- 23 Cassinotti P, Siegl G, Michel BA, Bruhlmann P. (1998) Presence and significance of human parvovirus B19 DNA in synovial membranes and bone marrow from patients with arthritis of unknown origin. *J Med Virol.* 56:199-204.

- 24 Cassinotti P, Siegl G. (2002) Parvoviren in: Doerr H.W, Gerlich W.H. Medizinische Virologie, Thieme Verlag, Stuttgart: 343-351
- 25 Cooling LL, Koerner TA, Naides SJ. (1995) Multiple glycosphingolipids determine the tissue tropism of parvovirus B19. *J Infect Dis.* 172:1198-205.
- 26 Cohen BJ, Buckley MM. (1988) The prevalence of antibody to human parvovirus B19 in England and Wales. *J Med Microbiol.* 25:151-3.
- 27 Cohen JH, Lenoir GM. (1982) Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis: are rheumatoid arthritis associated nuclear antigen and Epstein-Barr virus nuclear antigen different? *Biomed Pharmacother.* 36:246-9.
- 28 Cossart YE, Field AM, Cant B, Widdows D. (1975) Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet.* 1:72-3.
- 29 Costenbader KH, Karlson EW. (2006) Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis: is there a link? *Arthritis Res Ther.* 8:204. Review.
- 30 Countryman J, Miller G. (1985) Activation of expression of latent Epstein-Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA. *Proc Natl Acad Sci* 82:4085-9.
- 31 Cutolo M, Villaggio B, Craviotto C, Pizzorni C, Serio B, Sulli A. (2002) Sex hormones and rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 1:284-9. Review.
- 32 Cutolo M, Sulli A, Capellino S, Villaggio B, Montagna P, Serio B, Straub RH. (2004) Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus.* 13:635-8. Review.

## D

- 33 Dayer JM. (2003) The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 42 Suppl 2:ii3-10. Review.
- 34 Dijkmans BA, van Elsacker-Niele AM, Salimans MM, van Albada-Kuipers GA, de Vries E, Weiland HT. (1985) Human parvovirus B19 DNA in synovial fluid. *Arthritis Rheum.* 31:279-81
- 35 Doerr HW, Gerlich WH *Medizinische Virologie* Thieme ISBN: 3131139617
- 36 Dugowson CE, Koepsell TD, Voigt LF, Bley L, Nelson JL, Daling JR. (1991) Rheumatoid arthritis in women. Incidence rates in group health cooperative. *Arthritis Rheum.* 34:1502-7.

**E**

- 37 Einsele H, Steidle M, Muller CA, Fritz P, Zacher J, Schmidt H, Saal JG. (1992) Demonstration of cytomegalovirus (CMV) DNA and anti-CMV response in the synovial membrane and serum of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 19:677-81.

**F**

- 38 Ferraro AS, Newkirk MM. (1993) Correlative studies of rheumatoid factors and anti-viral antibodies in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.* 92:425-31.
- 39 Ferrell PB, Aitcheson CT, Pearson GR, Tan EM. (1981) Seroepidemiological study of relationships between Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 67:681-7
- 40 Firestein GS. (2003) Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature.* 423:356-61. Review.
- 41 Firestein GS. (2005) Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol.* ;11(3 Suppl):S39-44. Review.
- 42 Fox R, Sportsman R, Rhodes G, Luka J, Pearson G, Vaughan J. (1986) Rheumatoid arthritis synovial membrane contains a 62,000-molecular-weight protein that shares an antigenic epitope with the Epstein-Barr virus-encoded associated nuclear antigen. *J Clin Invest.* 77:1539-47
- 43 Friedman HM, Pincus T, Gibilisco P, Baker D, Glazer JP, Plotkin SA, Schumacher HR. (1980) Acute monoarticular arthritis caused by herpes simplex virus and cytomegalovirus. *Am J Med.* 69:241-7.

**G**

- 44 Gärtner B, Müller-Lantzsch N, Herpesviren: allgemein. (2002) In: Doerr H.W, Gerlich W. H, *Medizinische Virologie*, Thieme, Stuttgart, pp 370-398
- 45 Gladman DD (1998) Psoriatic arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 24:829-44, Review.
- 46 Gulley ML., Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases (2001), *J Mol Diagn.* 2001 3(1):1-10. Review

- 47 Gendi NS, Gibson K, Wordsworth BP. (1996) Effect of HLA type and hypocomplementaemia on the expression of parvovirus arthritis: one year follow up of an outbreak. *Ann Rheum Dis.* 55:63-5.
- 48 Goldblatt F, Isenberg DA. (2005) New therapies for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.* 140:195-204. Review.
- 49 Goldmacher VS, Bartle LM, Skaletskaya A, Dionne CA, Kedersha NL, Vater CA, Han JW, Lutz RJ, Watanabe S, Cahir McFarland ED, Kieff ED, Mocarski ES, Chittenden T. (1999) A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci* 96:12536-41
- 50 Gran JT, Johnsen V, Myklebust G, Nordbo SA. (1995) The variable clinical picture of arthritis induced by human parvovirus B19. Report of seven adult cases and review of the literature *Scand J Rheumatol.* 24:174-9.
- 51 Grant SF, Thorleifsson G, Frigge ML, Thorsteinsson J, Gunnlaugsdottir B, Geirsson AJ, Gudmundsson M, Vikingsson A, Erlendsson K, Valsson J, Jonsson H, Gudbjartsson DF, Stefansson K, Gulcher JR, Steinsson K. (2001) The inheritance of rheumatoid arthritis in Iceland. *Arthritis Rheum.* 2001 44:2247-54.
- 52 Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. (1987) The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 30:1205-13.

## H

- 53 Hamerman D, Gresser I, Smith C. (1982) Isolation of cytomegalovirus from synovial cells of a patient with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 9:658-64.
- 54 Hammerschmidt W, Sugden B. (1988) Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell.* 55:427-33.
- 55 Harkins L, Volk AL, Samanta M, Mikolaenko I, Britt WJ, Bland KI, Cobbs CS. (2002) Specific localisation of human cytomegalovirus nucleic acids and proteins in human colorectal cancer. *Lancet.* 2002 360:1557-63.
- 56 Henderson S, Rowe M, Gregory C, Croom-Carter D, Wang F, Longnecker R, Kieff E, Rickinson A. (1991) Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* 65:1107-1115
- 57 Hokynar K, Brunstein J, Soderlund-Venermo M, Kiviluoto O, Partio EK, Kontinen Y, Hedman K. (2000) Integrity and full coding sequence of B19 virus DNA persisting in human synovial tissue. *J Gen Virol.* 81:1017-25.

**I**

- 58 Ikeuchi H, Kuroiwa T, Hiramatsu N, Kaneko Y, Hiromura K, Ueki K, Nojima Y. (2005) Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis Rheum.* 2005 Apr;52(4):1037-46.
- 59 Imai S, Nishikawa J, Takada K. (1998) Cell-to-cell contact as an efficient mode of Epstein-Barr virus infection of diverse human epithelial cells *J Virol.* 72:4371-8.
- 60 Imai Y, Sato T, Yamakawa M, Kasajima T, Suda A, Watanabe Y. (1989) A morphological and immunohistochemical study of lymphoid germinal centers in synovial and lymph node tissues from rheumatoid arthritis patients with special reference to complement components and their receptors. *Acta Pathol Jpn.*; 39:127-34.

**J**

- 61 Jarvinen P, Aho K. (1994) Twin studies in rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum.* 24:19-28.
- 62 Johnson RA, Wang X, Ma XL, Huong SM, Huang ES. (2001) Human cytomegalovirus up-regulates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) pathway: inhibition of PI3-K activity inhibits viral replication and virus-induced signaling. *J Virol.* 75:6022-32.

**K**

- 63 Kandolf R, Kirschner P, Hofschneider PH, Vischer TL (1989) Detection of parvovirus in a patient with "reactive arthritis" by in situ hybridization. *Clin Rheumatol.* 8:398-401
- 64 Kerr JR, Cartron JP, Curran MD, Moore JE, Elliott JR, Mollan RA. (1995) A study of the role of parvovirus B19 in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol.* 34:809-13.
- 65 Kerr JR, Coyle PV, DeLeys RJ, Patterson CC (1996) Follow-up study of clinical and immunological findings in patients presenting with acute parvovirus B19 infection. *J Med Virol.* 48:68-75.
- 66 Kerr JR, Boyd N. (1996) Autoantibodies following parvovirus B19 infection. *J Infect.* 32:41-7.
- 67 Kerr JR. (2000) Pathogenesis of human parvovirus B19 in rheumatic disease. *Ann Rheum Dis.* 59:672-83

- 68 Kilger E, Kieser A, Baumann M, Hammerschmidt W. (1998) Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor *EMBO J.* 17:1700-9.
- 69 Klouda PT, Corbin SA, Bradley BA, Cohen BJ, Woolf AD. (1986) HLA and acute arthritis following human parvovirus infection *Tissue Antigens.* 28:318-9.
- 70 Kosaka S. (1979) Detection of antibody to a new antigen induced by Epstein-Barr virus in rheumatoid arthritis. *Tohoku J Exp Med.* 127:157-60.
- 71 Krause A, Kamradt T, Burmester GR. (1996) Potential infectious agents in the induction of arthritides. *Curr Opin Rheumatol.* 8:203-9. Review.
- 72 Kulwichit W, Edwards RH, Davenport EM, Baskar JF, Godfrey V, Raab-Traub N. (1998): Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci* 95: 11963-8
- 73 Kurtzman GJ, Ozawa K, Cohen B, Hanson G, Oseas R, Young NS. (1987) Chronic bone marrow failure due to persistent B19 parvovirus infection. *N Engl J Med.* 3;317:287-94.

## L

- 74 Landini MP, La Placa M. (1991) Humoral immune response to human cytomegalovirus proteins: a brief review. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 14:97-105. Review.
- 75 Lawrence JS. (1969) The epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2:1-36. Review.
- 76 Lemmel EM, Botzenhardt (1988) *Rheumtoide Arthritis. Klinische Rheumatologie* Springer Verlag 292-344
- 77 Lennerz C, Madry H, Ehlhardt S, Venzke T, Zang KD, Mehraein Y. (2004) Parvovirus B19-related chronic monoarthritis: immunohistochemical detection of virus-positive lymphocytes within the synovial tissue compartment: two reported cases. *Clin Rheumatol.* 23:59-62.
- 78 Levitskaya J, Coram M, Levitsky V, Imreh S, Steigerwald-Mullen PM, Klein G, Kurilla MG, Masucci MG. (1995) Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature.* 375:685-8.
- 79 Li H.P, Chang Chang Y.S, (2003) Epstein-Barr virus latent membrane protein 1: structure and functions. *J Biomed Sci.* 10: 490-504.
- 80 Lunardi C, Tiso M, Borgato L, Nanni L, Millo R, De Sandre G, Severi AB, Puccetti A. (1998) Chronic parvovirus B19 infection induces the production of

anti-virus antibodies with autoantigen binding properties. *Eur J Immunol.* 28:936-48.

- 81 Lundqvist A, Tolfvenstam T, Brytting M, Stolt CM, Hedman K, Broliden K. (1999) Prevalence of parvovirus B19 DNA in bone marrow of patients with haematological disorders. *Scand J Infect Dis.* 31:119-22.

## M

- 82 MacGregor AJ, Bamber S, Carthy D, Vencovsky J, Mageed RA, Ollier WE, Silman AJ. (1995) Heterogeneity of disease phenotype in monozygotic twins concordant for rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol.* 34:215-20.
- 83 MacGregor A, Ollier W, Thomson W, Jawaheer D, Silman A. (1995) HLA-DRB1\*0401/0404 genotype and rheumatoid arthritis: increased association in men, young age at onset, and disease severity. *J Rheumatol.* 22:1032-6.
- 84 MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, Silman AJ. (2000) Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum.* 43:30-7
- 85 Mainou BA, Everly DN Jr, Raab-Traub N. (2005) Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 CTAR1 mediates rodent and human fibroblast transformation through activation of PI3K. *Oncogene.* 24:6917-24.
- 86 Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*
- 87 McInnes IB, Gracie JA. (2004) Targeting cytokines beyond tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 6:336-42.
- 88 McGavran MH, Smith MG. (1965) Ultrastructural, cytochemical, and microchemical observations on cytomegalovirus infection of human cells in tissue culture *Exp Mol Pathol.* 76:1-10.
- 89 Mehraein Y, Rehder H, Draeger HG, Froster-Iskenius UG, Schwinger E, Holzgreve W. (1991) [Diagnosis of fetal virus infections by in situ hybridization] *Geburtshilfe Frauenheilkd.* ;51:984-9. German.
- 90 Mehraein Y, Lennerz C, Ehlhardt S, Venzke T, Ojak A, Remberger K, Zang KD. (2003) Detection of parvovirus B19 capsid proteins in lymphocytic cells in synovial tissue of autoimmune chronic arthritis. *Mod Pathol.* 16:811-7
- 91 Mehraein Y, Lennerz C, Ehlhardt S, Remberger K, Ojak A, Zang KD. (2004a) Latent Epstein-Barr virus (EBV) infection and cytomegalovirus (CMV) infection in synovial tissue of autoimmune chronic arthritis determined by RNA- and DNA-in situ hybridization. *Mod Pathol.* 17:781-9.

- 92 Mehraein Y, Lennerz C, Ehlhardt S, Zang KD, Madry H. (2004b) Replicative multivirus infection with cytomegalovirus, herpes simplex virus 1, and parvovirus B19, and latent Epstein-Barr virus infection in the synovial tissue of a psoriatic arthritis patient. *J Clin Virol.* 31:25-31.
- 93 Middleton T, Gahn TA, Martin JM, Sugden B. (1991) Immortalizing genes of Epstein-Barr virus. *Adv Virus Res.*; 40:19-55. Review
- 94 Miki NP, Chantler JK. (1992) Non-permissiveness of synovial membrane cells to human parvovirus B19 in vitro. *J Gen Virol.* 1992 Jun;73 ( Pt 6):1559-62.
- 95 Miller E, Fairley CK, Cohen BJ, Seng C. (1998) Immediate and long term outcome of human parvovirus B19 infection in pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol.* 105:174-8.
- 96 Modrow S, Dorsch S. (2002) Antibody responses in parvovirus B19 infected patients. *Pathol Biol (Paris).* 2002 Jun;50(5):326-31
- 97 Modrow S, Falke D, Truyen U, Herpesviren. (2003) In: Modrow S, Falke D, Truyen (eds). *Molekulare Virologie*, 2<sup>nd</sup> edn. Spectrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin: 514-613
- 98 Mousavi-Jazi M, Bostrom L, Lovmark C, Linde A, Brytting M, Sundqvist VA. (1998) Infrequent detection of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus DNA in synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 25:623-8.
- 99 Murai C, Munakata Y, Takahashi Y, Ishii T, Shibata S, Muryoi T, Funato T, Nakamura M, Sugamura K, Sasaki T (1999) Rheumatoid arthritis after human parvovirus B19 infection *Ann Rheum Dis.* 58:130-2.
- 100 Murayama T, Jisaki F, Ayata M, Sakamuro D, Hironaka T, Hirai K, Tsuchiya N, Ito K, Furukawa T. (1992) Cytomegalovirus genomes demonstrated by polymerase chain reaction in synovial fluid from rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol.* 10:161-4.
- 101 Murayama T, Tsuchiya N, Jisaki F, Ozaki M, Sakamuro D, Hirai K, Shimizu S, Ito K, Matsushima K, Furukawa T. (1994) Elevated cytokine levels in synovial fluid of rheumatoid arthritis correlates with the presence of cytomegalovirus genome. *Autoimmunity.* 17:333-7.
- 102 Musiani M, Zerbini M, Ferri S, Plazzi M, Gentilomi G, La Placa M. (1987) Comparison of the immune response to Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in sera and synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 46:837-42.

**N**

- 103 Naides SJ, Scharosch LL, Foto F, Howard EJ (1990) Rheumatologic manifestations of human parvovirus B19 infection in adults. Initial two-year clinical experience *Arthritis Rheum.* 33:1297-309
- 104 Nepom GT, Byers P, Seyfried C, Healey LA, Wilske KR, Stage D, Nepom BS. (1989) HLA genes associated with rheumatoid arthritis. Identification of susceptibility alleles using specific oligonucleotide probes. *Arthritis Rheum.* 32:15-21.
- 105 Niedobitek G, Lisner R, Swoboda B, Rooney N, Fassbender HG, Kirchner T, Aigner T, Herbst H. (2000) Lack of evidence for an involvement of Epstein-Barr virus infection of synovial membranes in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000 Jan;43(1):151-4.
- 106 Niedobitek G, Herbst H. (2001) In situ detection of Epstein-Barr virus DNA and viral gene products. *Methods Mol Biol.* 174:79-91
- 107 Nikkari S, Luukkainen R, Mottonen T, Meurman O, Hannonen P, Skurnik M, Toivanen P. (1994) Does parvovirus B19 have a role in rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis.* 53:106-11.
- 108 Noll S., Schaub-Kuhnen S. *Praxis der Immunhistochemie*, ISBN 3-437-45526-5

**O**

- 109 Ollier W. (2000) Rheumatoid arthritis and Epstein-Barr virus: a case of living with the enemy? *Ann Rheum Dis.* 59:497-9.
- 110 Ostensen M, Forger F, Nelson JL, Schuhmacher A, Hebisch G, Villiger PM. (2005) Pregnancy in patients with rheumatic disease: anti-inflammatory cytokines increase in pregnancy and decrease post partum. *Ann Rheum Dis.* 64:839-44

**P**

- 111 Phillips PE. Viral arthritis. (1997) *Curr Opin Rheumatol.* 9:337-44. Review
- 112 Peichl P, Scriba M, Haberhauer G, Broll H. (1988) Selective binding of rheumatoid factors to antigen structures of cytomegalovirus (CMV). *Scand J Rheumatol Suppl.* 75:117-22.

**R**

- 113 Reid DM, Reid TM, Brown T, Rennie JA, Eastmond CJ. (1985) Human parvovirus-associated arthritis: a clinical and laboratory description. *Lancet*. 1985 Feb 23;1(8426):422-5.
- 114 Reviron D, Perdriger A, Toussiroit E, Wendling D, Balandraud N, Guis S, Semana G, Tiberghien P, Mercier P, Roudier J. (2001) Influence of shared epitope-negative HLA-DRB1 alleles on genetic susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 44:535-40
- 115 Rickinson AB, Lee SP, Steven NM. (1996) Cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus. *Curr Opin Immunol*. 8:492-7. Review
- 116 Roudier J, Rhodes G, Petersen J, Vaughan JH, Carson DA. (1988) The Epstein-Barr virus glycoprotein gp110, a molecular link between HLA DR4, HLA DR1, and rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol*. 27:367-71
- 117 Roudier J, Petersen J, Rhodes GH, Luka J, Carson DA. (1989) Susceptibility to rheumatoid arthritis maps to a T-cell epitope shared by the HLA-Dw4 DR beta-1 chain and the Epstein-Barr virus glycoprotein gp110. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86:5104-8.

**S**

- 118 Saal JG, Steidle M, Einsele H, Muller CA, Fritz P, Zacher J. (1992) Persistence of B19 parvovirus in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 12:147-51.
- 119 Saal JG, Krimmel M, Steidle M, Gerneth F, Wagner S, Fritz P, Koch S, Zacher J, Sell S, Einsele H, Muller CA. (1999) Synovial Epstein-Barr virus infection increases the risk of rheumatoid arthritis in individuals with the shared HLA-DR4 epitope. *Arthritis Rheum*. 42:1485-96.
- 120 Samanta M, Harkins L, Klemm K, Britt WJ, Cobbs CS. (2003) High prevalence of human cytomegalovirus in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma. *J Urol*. 2003 Sep;170(3):998-1002.
- 121 Sawada S, Takei M. (2005) Epstein-Barr virus etiology in rheumatoid synovitis. *Autoimmun Rev*. 4:106-10.
- 122 Sculley TB, Walker PJ, Moss DJ, Pope JH (1984) . Identification of multiple Epstein-Barr virus-induced nuclear antigens with sera from patients with rheumatoid arthritis. *J Virol*. 52:88-93.
- 123 Sekine T, Kato T, Masuko-Hongo K, Nakamura H, Yoshino S, Nishioka K, Yamamoto K. (1999) Type II collagen is a target antigen of clonally expanded T

- cells in the synovium of patients with rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis.* 58:446-50.
- 124 Severi B, Landini MP, Govoni E (1988). Human cytomegalovirus morphogenesis: an ultrastructural study of the late cytoplasmic phases. *Arch Virol.* 98:51-64.
- 125 Silman A, Kay A, Brennan P. (1992) Timing of pregnancy in relation to the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 35:152-5.
- 126 Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, Ollier WE. (1993) Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol.* 32:903-7
- 127 Singh R, Robinson DB, El-Gabalawy HS. (2005) Emerging biologic therapies in rheumatoid arthritis: cell targets and cytokines. *Curr Opin Rheumatol.* 17:274-9. Review.
- 128 Söderlund M, von Essen R, Haapasaari J, Kiistala U, Kiviluoto O, Hedman K. (1997) Persistence of parvovirus B19 DNA in synovial membranes of young patients with and without chronic arthropathy. *Lancet.* 12;349:1063-5.
- 129 Spector TD, Roman E, Silman AJ. (1990) The pill, parity, and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 33:782-9.
- 130 Speyer I, Breedveld FC, Dijkmans BA. (1998) Human parvovirus B19 infection is not followed by inflammatory joint disease during long term follow-up. A retrospective study of 54 patients. *Clin Exp Rheumatol.* 16:576-8.
- 131 Stahl HD, Hubner B, Seidl B, Liebert UG, van der Heijden IM, Wilbrink B, Kraan MC, Emmrich F, Tak PP (2000) Detection of multiple viral DNA species in synovial Tissue and fluid of patients with early arthritis. *Ann Rheum Dis* 59:342-346
- 132 Strunk J, Lange U, Muller-Ladner U. (2005) Rheumatoid arthritis, *Dtsch Med Wochenschr.* 130:1761-8 Review.
- 133 Srivastava A, Lu L. (1988) Replication of B19 parvovirus in highly enriched hematopoietic progenitor cells from normal human bone marrow. *J Virol.* 62:3059-63

## T

- 134 Takahashi Y, Murai C, Shibata S, Munakata Y, Ishii T, Ishii K, Saitoh T, Sawai T, Sugamura K, Sasaki T. (1998) Human parvovirus B19 as a causative agent for rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:8227-32

- 135 Takeda T, Mizugaki Y, Matsubara L, Imai S, Koike T, Takada K., (2000) Lytic Epstein-Barr virus infection in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43:1218-25
- 136 Takei M, Mitamura K, Fujiwara S, Horie T, Ryu J, Osaka S, Yoshino S, Sawada S. (1997) Detection of Epstein-Barr virus-encoded small RNA 1 and latent membrane protein 1 in synovial lining cells from rheumatoid arthritis patients. *Int Immunol.* 9:739-43.
- 137 Tamm A, Ziegler T, Lautenschlager I, Nikkari S, Möttönen T, Luukkainen R, Skurnik M, Toivanen P. (1993) Detection of cytomegalovirus DNA in cells from synovial fluid and peripheral blood of patients with early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 20:1489-93
- 138 Taylor PC. (2003) Anti-cytokines and cytokines in the treatment of rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des.* 9:1095-106. Review.
- 139 Thomson W, Harrison B, Ollier B, Wiles N, Payton T, Barrett J, Symmons D, Silman A. (1991) Quantifying the exact role of HLA-DRB1 alleles in susceptibility to inflammatory polyarthritis: results from a large, population-based study *Arthritis Rheum.* 42:757-62.
- 140 Tolfvenstam T, Papadogiannakis N, Norbeck O, Petersson K, Broliden K. (2001) Frequency of human parvovirus B19 infection in intrauterine fetal death. *Lancet.* 2001 357:1494-7.
- 141 Tomkinson B, Robertson E, Kieff E. (1993) Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol.* 67:2014-25.
- 142 Tosato G, Steinberg AD, Blaese RM. (1981) Defective EBV-specific suppressor T-cell function in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 305:1238-43
- 143 Tosato G, Steinberg AD, Yarchoan R, Heilman CA, Pike SE, De Seau V, Blaese RM. (1984) Abnormally elevated frequency of Epstein-Barr virus-infected B cells in the blood of patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 73:1789-95
- 144 Toussiroit E, Auger I, Roudier C, Luka J, Wendling D, Tiberghien P, Roudier J. (1999) HLA-DR polymorphism influences T-cell precursor frequencies to Epstein-Barr virus (EBV) gp110: implications for the association of HLA-DR antigens with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens.* 54:146-52.
- 145 Toussiroit E, Wendling D, Tiberghien P, Luka J, Roudier J. (2000) Decreased T cell precursor frequencies to Epstein-Barr virus glycoprotein Gp110 in peripheral blood correlate with disease activity and severity in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 59:533-8.
- 146 Tyndall A, Jelk W, Hirsch HH (1994) Parvovirus B19 and erosive polyarthritis. *Lancet.* 343:480-1.

**V**

- 147 van Kuijk AW, Reinders-Blankert P, Smeets TJ, Dijkmans BA, Tak PP. (2006) Detailed analysis of the cell infiltrate and the expression of mediators of synovial inflammation and joint destruction in the synovium of patients with psoriatic arthritis: implications for therapy *Ann Rheum Dis.* 2006
- 148 Vancikova Z, Dvorak P. (2001) Cytomegalovirus infection in immunocompetent and immunocompromised individuals--a review. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 1:179-87. Review
- 149 Venables PJ, Pawlowski T, Mumford PA, Brown C, Crawford DH, Maini RN. (1988) Reaction of antibodies to rheumatoid arthritis nuclear antigen with a synthetic peptide corresponding to part of Epstein-Barr nuclear antigen 1. *Ann Rheum Dis.* 47:270-9.

**W**

- 150 Wang D, Liebowitz D, Kieff E. (1985) An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell.* 43:831-40.
- 151 Wang D, Liebowitz D, Wang F, Gregory C, Rickinson A, Larson R, Springer T, Kieff E. (1988): Epstein-Barr virus latent infection membrane protein alters the human B-lymphocyte phenotype: Deletion of the amino terminus abolishes activity. *J Virol* 62:4173-4184
- 152 Wang F, Gregory C, Sample C, Rowe M, Liebowitz D, Murray R, Rickinson A, Kieff E. (1990): Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. *J Virol* 64:2309-2318
- 153 Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. (1993) Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today.* 14:353-6. Review.
- 154 White DG, Woolf AD, Mortimer PP, Cohen BJ, Blake DR, Bacon PA (1985) Human parvovirus arthropathy *Lancet.* 1985 1:419-21.
- 155 Williams RC Jr, Sibbitt WL Jr, Husby G. (1986) Oncogenes, viruses, or rheumogenes? *Am J Med.* 1986 Jun;80(6):1011-6
- 156 Woolf AD, Champion GV, Chishick A, Wise S, Cohen BJ, Klouda PT, Caul O, Dieppe PA. (1989) Clinical manifestations of human parvovirus B19 in adults. *Arch Intern Med.* 149:1153-6.

- 157 Wordsworth BP, Lanchbury JS, Sakkas LI, Welsh KI, Panayi GS, Bell JI. (1989) HLA-DR4 subtype frequencies in rheumatoid arthritis indicate that DRB1 is the major susceptibility locus within the HLA class II region. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:10049-53.

## Y

- 158 Yurochko AD, Kowalik TF, Huong SM, Huang ES. (1995) Human cytomegalovirus upregulates NF-kappa B activity by transactivating the NF-kappa B p105/p50 and p65 promoters. *J Virol.* 69:5391-400.
- 159 Yang X, Sham JS, Ng MH, Tsao SW, Zhang D, Lowe SW, Cao L. (2000) LMP1 of Epstein-Barr virus induces proliferation of primary mouse embryonic fibroblasts and cooperatively transforms the cells with a p16-insensitive CDK4 oncogene. *J Virol.* 74:883-91.

## Z

- 160 Zhang L, Nikkari S, Skurnik M, Ziegler T, Luukkainen R, Mottonen T, Toivanen P. (1993) Detection of herpesviruses by polymerase chain reaction in lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 36:1080-6.
- 161 Zhu H, Shen Y, Shenk T. (1995) Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. *J Virol.* 69:7960-70.



## 8 Publikationen/Dank

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden publiziert in:

- *Yasmin Mehraein, Carsten Lennerz, Sandra Ehlhardt, Thorsten Venzke, Andreas Ojak, Klaus Remberger, Klaus Zang*  
Deterction of Parvovirus B19 Capsid Proteins in Lymphocytic Cells in Synovial Tissue of Autoimmune Chronic Arthritis. *Mod Pathol* (2003)16: 811-817
  
- *Carsten Lennerz, Henning Madry, Sandra Ehlhardt, Thomas Venzke, Klaus D. Zang, Yasmin Mehraein*  
Parvovirus B19-related chronic monoarthritis: immunohistochemical detection of virus-positive lymphocytes within the synovial tissue compartment: Two reported cases. *Clin Rheumatol* (2004)23: 59-62
  
- *Yasmin Mehraein, Carsten Lennerz, Sandra Ehlhardt, Klaus Remberger, Andreas Ojak, Klaus D. Zang*  
Latent Epstein-Barr virus (EBV) infection and cytomegalovirus (CMV) infection in synovial tissue of autoimmune chronic arthritis determined by RNA- and DNA-*in situ* hybridization. *Mod Pathol* (2004)17: 781-789
  
- *Yasmin Mehraein, Carsten Lennerz, Sandra Ehlhardt, Klaus D. Zang, Henning Madry*  
Replicative multivirus infection with cytomegalovirus, herpes simplex virus 1, and parvovirus B19, and latent Epstein-Barr virus infection in the synovial tissue of a psoriatic arthritis patient. *J Clin Virol* (2004)31: 25-31

## Danksagung

Mein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. med. K. Zang, dem ehemaligen Leiter des Institutes für Humangenetik der Universität des Saarlandes, für die hervorragenden Arbeitsbedingungen sowie für seine Unterstützung und wohlwollende Förderung bei der Durchführung meines Promotionsvorhabens an seinem Institut. Ferner möchte ich mich für seine Initiative und seine Empfehlung im Auswahlverfahren der Studienstiftung des deutschen Volkes bedanken.

Insbesondere danke ich Frau PD Dr. med. Y. Mehraein für die Überlassung des Themas, für die kompetente Einarbeitung in die Methodik und ihre Anregung zur selbstständigen, wissenschaftlichen Tätigkeit. Sie stand mir nicht nur jederzeit für Fragen und Diskussionen diese Arbeit betreffend zur Verfügung, sondern verfolgte darüber hinaus mit Interesse mein Medizinstudium und unterstützte mich stets mit wertvollen Ratschlägen. Als meine Mentorin hat sie wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ohne eine Reihe von aufgeschlossenen Kooperationen wäre diese Untersuchung nicht möglich gewesen. Im Besonderen möchte ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. med. K. Remberger, dem ehemaligen Leiter des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Homburg, sowie Herrn Prof. Dr. med. D. Kohn, dem Leiter der Orthopädischen Universitätsklinik Homburg, für die Kooperation v.a. bei der Gewinnung der Synovialproben danken. Für die Übermittlung von Untersuchungsmaterial danke ich weiterhin Herrn Andreas Ojak, orthopädischer Operateur der Abteilung Rheumaorthopädie des Bundesknappschafts-Krankenhauses Püttlingen, sowie Herrn Prof. Arnold, dem Leiter der Abteilung für Pathologie am Städtischen Krankenhaus Augsburg.

Insbesondere für die Bereitstellung der EBER-Plasmide, aber auch für die vielgestaltige Hilfestellung und Unterstützung möchte ich Herrn Prof. F. Grässer sowie allen weiteren Mitarbeitern des Virologischen Institutes der Universität des Saarlandes in Homburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. N. Müller-Lantsch danken. Für die Übermittlung des nicht kommerziell erhältlichen Parvovirus B19-Antikörpers bin ich Herrn Dr. Beschle und Herrn Bodo Fischer von der Firma Dade-Behring zu Dank verpflichtet.

Mein größter Dank gilt schließlich meiner Familie, auf deren Unterstützung und Verständnis stets Verlass war. Ohne den Rückhalt und die Freiräume, die mir meine Eltern gewährten, hätte ich mich nicht derart sorgenfrei meinem Medizinstudium und dieser Arbeit widmen können. Meinem Bruder Christian danke ich für sein stetiges Interesse an meinem Werdegang und seine wertvollen Ratschläge.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

*Name* Carsten Lennerz  
*Geburtsdatum* 29.03.1978  
*Geburtsort* Saarbrücken

### Schulbildung

*08.1988 - 06.1997* Robert-Schuman Gymnasium in Saarlouis  
Schulabschluss: allgemeine Hochschulreife

### Wehrdienst

*11.1997 - 08.1998* Grundwehrdienst als Sanitätssoldat in Halle und Saarlouis

### Hochschulstudium

*10/1998* Studiengang Humanmedizin an der Universität des Saarlandes  
*09/2000* Physikum  
*09/2001* Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
*11/2001 - 09/2003* Durchführung des experimentellen Teils der Promotion am  
Institut für Humangenetik der Universität des Saarlandes  
(Institutsleiter Prof. Dr. K. Zang)  
*04/2004* Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
*10/2005* Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
*12/2005* Approbation

### Praktika

*03.2001 - 04.2001* Famulatur in der Chirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes  
*03.2002 - 04.2002* Famulatur in der Orthopädie, Kantonsspital Luzern  
*08.2002 - 09.2002* Famulatur in der Kardiologie, Royal Brompton Hospital  
Imperial College School of Medicine, London

- 04.2004 - 08.2004* Erstes Tertial des Praktischen Jahres in der Orthopädie  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg
- 08.2004 - 12.2004* Zweites Tertial des Praktischen Jahres in der Inneren Medizin,  
Kantonsspital Zug, Universität Zürich
- 12.2004 - 04.2005* Drittes Tertial des Praktischen Jahres in der Chirurgie  
Royal Victoria Hospital, McGill University, Montreal  
und Universitätsklinik des Saarlandes, Homburg

### **Berufserfahrung**

- 04.2002 - 04.2004* Dozent für das Fach Physiologie an der staatlich anerkannten  
Schule für Physiotherapie in Pirmasens
- 02.2005* Assistenzarzt in der Abteilung Innere Medizin III, Kardiologie  
Universitätsklinikum d. Saarlandes, (Direktor Prof. Dr. M. Böhm)

### **Stipendien**

- 09.2002* Stipendium der Dr. Carl Duisberg Stiftung (Bayer)
- 03.2003* Aufnahme in die Studienstiftung des Deutschen Volkes
- 07.2003* e-fellow.net Stipendium
- 01.2005* Auslandsstipendium der Studienstiftung des Deutschen Volkes





# Anhang

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	<b>Abbildung</b>
AEC	3- <b>Amino-9-ethylcarbazol</b>
Ak	<b>Antikörper</b>
APAAP	<b>Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase</b>
aqua dest.	aqua destillata
B19	Parvovirus <b>B19</b>
BCIP	5- <b>Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat</b>
bio.	<b>biotinyliert</b>
BSA	<b>Bovine Serum Albumin</b>
bzw.	<b>beziehungsweise</b>
CD	cluster of <b>d</b> ifferentiation
CMV	<b>Cytomegalievirus</b>
°C	Grad Celsius
DAB	3,3- <b>Diaminobenzidine</b>
DEPC	<b>Diethylpyrocarbonat</b>
d.h.	<b>das heißt</b>
DNA	<b>Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)</b>
DNase	<b>Desoxyribonuklease</b>
DTT	<b>Dithiotreitol</b>
EA	<b>Early Antigen</b>
EBER	<b>Epstein-Barr Virus encoded small RNA</b>
EBNA	<b>Epstein-Barr Virus nuclear Antigen</b>
EBV	<b>Epstein-Barr Virus</b>
h	Stunde
HLA	<b>Humanes Leukozyten Antigen-System</b>
HRP	<b>horseradish Peroxidase = Meerrettich-Peroxidase</b>
IgG	<b>Immunglobulin der Klasse G</b>
IgM	<b>Immunglobulin der Klasse M</b>
IHC	<b>Immunhistochemie</b>
Il	<b>Interleukin</b>
ISH	<b><i>in situ</i>-Hybridisierung</b>
l	<b>Liter</b>

---

LMP	<b>L</b> atent <b>M</b> embrane <b>P</b> rotein
MHC	<b>M</b> ajor <b>H</b> istocompatibility <b>C</b> omplex
min	<b>M</b> inute
mM	<b>M</b> illimolar
N	<b>N</b> ormalität
NBT	<b>N</b> itroblau-Tetrazoliumchlorid
nS	<b>n</b> ormale <b>S</b> ynovialis
OA	<b>O</b> steoarthritis
OT	<b>O</b> bjektträger
Parvo B19	<b>P</b> arvovirus <b>B19</b>
PBS	<b>P</b> hosphate <b>b</b> uffered <b>s</b> aline
PCR	<b>p</b> olymerase <b>c</b> hain <b>r</b> eaction
PSA	<b>P</b> soriasis- <b>A</b> rthritis
RA	<b>R</b> heumatoide <b>A</b> rthritis
rA/S	<b>r</b> eaktive <b>A</b> rthritis/ <b>S</b> ynovitis
rpm	<b>r</b> otations <b>p</b> er <b>m</b> inute
RNA	<b>R</b> ibonucleic acid ( <b>R</b> ibonukleinsäure)
RNase	<b>R</b> ibonuklease
RT	<b>R</b> aumtemperatur
SSC	<b>S</b> tandard <b>S</b> aline <b>C</b> itrat <b>P</b> uffer
Tab.	<b>T</b> abelle
Tris	<b>T</b> rishydroxymethylaminomethan <b>P</b> uffer
VP1	<b>v</b> irales <b>C</b> apsid <b>P</b> rotein 1
VP2	<b>v</b> irales <b>C</b> apsid <b>P</b> rotein 2
z.B.	zum <b>B</b> eispiel

## Tabellen

*Tabelle 16 detaillierte Darstellung des untersuchten Patientenkollektivs nach Fallnummer, Geschlecht, Alter, Präparatnummer und klinischer Diagnose*

Fall-Nr.	Geschlecht	Alter	Präparat-Nr.	Klinische Diagnose
1	♀	40	F 1692	Rheumatoide Arthritis
2	♂	44	F 1693 = R 1	Rheumatoide Arthritis
3	♀	40	R 4	Rheumatoide Arthritis
4	♀	13	R 5	Rheumatoide Arthritis
5	♀	50	R 6	Rheumatoide Arthritis
6	♀	71	R 7	Rheumatoide Arthritis
7	♂	64	R 8	Rheumatoide Arthritis
8	♀	74	R 9	Rheumatoide Arthritis
9	♀	37	R 20A	Rheumatoide Arthritis
10	♀	69	R 15	Rheumatoide Arthritis
11	♂	42	R16	Rheumatoide Arthritis
12	♂	66	13763 / 00	Rheumatoide Arthritis
13	♂	33	20445 / 00	Rheumatoide Arthritis
14	♀	5	448 / 01 II	Rheumatoide Arthritis
15	♂	32	11307 / 00	Rheumatoide Arthritis
16	♀	49	8891 / 00	Rheumatoide Arthritis
17	♀	58	R 21	Rheumatoide Arthritis
18	♂	63	6257 / 00	Rheumatoide Arthritis
19	♀	68	21245 / 00	Rheumatoide Arthritis
20	♂	40	Fe 20023 / 00	Rheumatoide Arthritis
21*	♀	29	17023 / 01	Rheumatoide Arthritis
22	♀	71	18224 / 01	Rheumatoide Arthritis
23	♀	23	13801 / 01	Rheumatoide Arthritis
24*	♀	29	19739 / 01	Rheumatoide Arthritis
25	♂	64	17660 / 01	Rheumatoide Arthritis, lymphoplasmazellulärer Typ
26	♂	65	3846 / 01	Rheumatoide Arthritis
27	♀	75	18548 / 01	Rheumatoide Arthritis
28	♀	73	7655 / 01	Rheumatoide Arthritis
29	♀	22	21957 / 01	Rheumatoide Arthritis
30	♂	34	10153 I / 98	Psoriasis Arthritis
31	♂	33	18827 / 98	Psoriasis Arthritis
32	♂	29	18671 / 01	Psoriasis Arthritis

Fall-Nr.	Geschlecht	Alter	Präparat-Nr.	Klinische Diagnose
33	♂	50	10670 / 01	Psoriasis Arthritis, Begleitsynovialitis bei Meniskusschaden
34	♂	64	Fe 8207 / 00	Psoriasis Arthritis, Rheumafaktor positiv
35	♂	54	aFe 269 / 00	Psoriasis Arthritis
36	♂	76	3314 / 00	Osteoarthritis**, klinisch Gonarthrose
37	♀	68	1235 / 01	Osteoarthritis**, atypische chron. Synovialitis, auch RA histologisch möglich
38	♀	71	2701 / 01	Osteoarthritis, Begleitsynovialitis bei Gonarthrose
39	♂	60	OA 1	Osteoarthritis
40	♀	71	OA 6	Osteoarthritis
41	♀	75	322 / 01	Osteoarthritis, chron. unspezifische Synovialitis, Abriebssynovialitis, Status nach Hüft-TEP
42	♀	65	19425 / 00	Osteoarthritis, Synovialitis bei Coxarthrose
43	♂	56	18516 / 00	Osteoarthritis, chron. Vernarbende unspezifische Synovialitis, Begleitsynovialitis bei Coxarthrose
44	♂	18	12516 / 01	Osteoarthritis, ausgeprägte, chron.-granulierende Synovialitis
45	♂	68	22064 / 01	Osteoarthritis, chron. unspezifisch vernarbende Synovialitis bei Prothesenabrieb, Detritus-Synovialitis
46	♀	20	2226 / 01	chron. unspezifische Synovialitis**, Plica-Syndrom, chron. Synovialitis, histologisch RA möglich
47	♀	77	2877 / 01	Osteoarthritis, Detritus-Synovialitis
48	♀	75	835 / 01	Osteoarthritis, Prothesenabriebssynovialitis
49	♂	69	18357 / 01	Osteoarthritis, Abriebssynovialitis bei gelockerter Knie-TEP
50	♂	74	20039 / 00	chron. fibrosierende vernarbende unspezifische Synovialitis
51	♀	71	Rn 5a	Hüftkopfnekrose
52	♂	39	16080 / 00	chron. unspezifische Synovialitis
53	♂	48	172 / 01	reaktive chron. unspezifische Synovialitis bei Meniskustrauma
54	♀	12	3239 / 01	reaktive chron. unspezifische Synovialitis
55	♀	77	21079 / 00	chron. floride unspezifische Synovialitis mit Fremdkörpergranulom
56	♀	54	3036 / 01 II	geringgradige chron. unspezifische Synovialitis bei Gelenkknorpelabsprengung
57	♀	60	3325 / 01	chron. unspezifische reaktive Synovialitis
58	♂	51	16846 / 00	Reaktive unspezifische Synovialitis
59	♂	77	1593 / 01	chron. fibrosierende vernarbende unspezifische Synovialitis
60	♂	57	5700 / 98	Noduläre Tenosynovitis
61	♀	52	3389 / 01 II	chron. unspezifische reaktive Synovialitis bei Meniskopathie
62	♂	17	Rn 1	normale Synovia (Autopsie)
63	♀	27	Rn 4	normale Synovia (Trauma)

♂ männlich, ♀ weiblich

\* Fall 21 und Fall 24 stellen Synovialproben verschiedener Gelenke desselben Patienten dar

\*\* histomorphologische Zeichen schließen die Diagnose Rheumatoide Arthritis nicht aus



Fall-Nr.	ParvoB19 IHC	EBV								CMV		Klinische Diagnose
		EBER1/2 ISH		LMP IHC		BZLF1 IHC		EBNA IHC		ISH	IHC	
		S	L	S	L	S	L	S	L			
34	+											PSA
35		-	+							+	+	PSA
36	++											rA/S
37	++											rA/S
38												rA/S
39		-	+	-	+	-	-	n.u.	n.u.	+		rA/S
40												rA/S
41	+ / ++	++	+	++	+	-	-	+	+			rA/S
42												rA/S
43												rA/S
44		-	+	-	+	-	-	n.u.	n.u.			rA/S
45												rA/S
46	+++	-	+	-	+	-	-	n.u.	n.u.	+		rA/S
47												rA/S
48												rA/S
49		-	+	-	+	-	-	n.u.	n.u.			rA/S
50	+											rA/S
51	+											rA/S
52	+											rA/S
53												rA/S
54												rA/S
55												rA/S
56	+ / ++	-	+	-	+	-	-	n.u.	n.u.			rA/S
57	+ / ++											rA/S
58										+		rA/S
59												rA/S
60												rA/S
61	+											rA/S
62												nS
63	+ / ++											nS

RA, Rheumatoide Arthritis; PSA, Psoriasis Arthritis; rA/S, chron. reactive Arthritis/Synovitis; ns, normale Synovia; n.u, nicht untersucht; IHC, Immunhistochemie; ISH, in situ-Hybridisierung; relevante, ausgeprägte Infektion, nicht nur einzelliger Virusnachweis (grau unterlegt)  
S, synovial lining cells; L, lymphatische Zellen;

## Puffer, Reagenzien und Großgeräte

### Puffer

#### Citratpuffer

Citronensäure pH 6.0                    1,0    M

#### Digoxigenin Puffer 1 (Dig 1)

Zusammensetzung:

Tris/HCl    pH 7.4                    0,10    M                    (Sigma)

NaCl                                    0,15    M                    (Merck)

Die Lösung wird aus Stocklösungen Tris/HCl (pH 7.4) 2M und NaCl 5M durch Verdünnung 1:20 bzw. 1:33,3 hergestellt.

#### Digoxigenin Puffer 3 (Dig 3)

Zusammensetzung:

Tris/HCl    pH 9.5                    0,10    M                    (Sigma)

NaCl                                    0,10    M                    (Merck)

MgCl<sub>2</sub>                                    0,05    M                    (Merck)

Der Puffer wird durch Verdünnung aus Stocklösungen 1M Tris/HCl (pH 9.5) 1: 10, 5M NaCl 1:50 und MgCl<sub>2</sub> 1:20 hergestellt.

#### DNA-ISH-Puffer (4x SSC/20% Dextransulfat)

Zusammensetzung:

4x SSC: NaCl 0,6                    M                    (Merck)

C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>·xH<sub>2</sub>O                    0,06    M                    (Merck)

Detransulfat 20%ig                    eingewogen                    (Amersham Pharmacia Biotech AB)

Dazu wird eine 20x konzentrierte SSC Puffer Stocklösung 1:5 mit aqua dest. verdünnt. Dextransulfat wird eingewogen (z.B. bei einem Zielvolumen von 50 ml werden 10g Dextransulfat eingewogen) und unter Wasserbadhitze von 90°C im Falcontube in Lösung gebracht.

#### GelladepufferII bzw. Ficoll-Gelladepuffer II

Zusammensetzung:

Ficoll                                    15    %                    (Sigma)

Bromphenolblau                    0,25    %                    (Sigma)

Xylene Cyanol FF                    0,25    %                    (Sigma)

die Chemikalien werden eingewogen und in 10 ml aqua dest. Gelöst

#### 5x Maleinsäurepuffer (NaCl 5M/Maleinsäure 0,5M)

Zusammensetzung:

NaCl                                    5,0    M                    (Merck)

Maleinsäure 0,5                    M                    (Merck)

Die Konzentrationen werden eingewogen und in aqua dest. gelöst. Der pH Wert wird durch Zugabe von NaOH pellets auf 7.5 eingestellt.

#### 10x MOPS Puffer

Zusammensetzung:

MOPS                                    0,4    M                    (Sigma)

EDTA                                    0,01    M                    (Sigma)

Natriumacetat                    0,1    M                    (Merck)

Die Salze werden in ein 1l aqua dest. eingewogen, in Lösung gebracht und der pH 7.0 mit NaOH eingestellt (Ansatz 11).

**5x NET-Puffer**

Zusammensetzung:

NaCl		2,5	M	(Merck)
EDTA	pH 8.0	0,0005	M	(Sigma)
Tris/HCl	pH 8.0	0,05	M	(Sigma)

**20x PBS-Puffer**

Zusammensetzung:

NaCl		160,0	g	(Merck)	(3,05 M)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·xH <sub>2</sub> O		29,25	g	(Merck)	(0,164 M)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,9		g	(Merck)	(0,036 M)

Die Salze werden eingewogen und in Aqua dest. mit dem Zielvolumen von 1000 ml gelöst. Der pH Wert wird mit 1N NaOH oder 1N HCl mittels pH Meter auf 7.2 eingestellt.

**REACT 2-Puffer** (GIBCO BRL)Standard-Reaktionspuffer für das Restriktionsenzym *Hind* III**REACT 3-Puffer** (GIBCO BRL)Standard-Reaktionspuffer für die Restriktionsenzyme *Eco*R 1 und *Bam*H 1**20x SSC (Standard Saline Citrat Puffer)**

Zusammensetzung:

NaCl		3,0	M	(Merk)
Trinatriumcitratdihydrat (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> ·xH <sub>2</sub> O)		0,3	M	

Für einen 1l Ansatz werden die o.g. Salze eingewogen und in 800 ml aqua dest. gelöst. Anschließend wird der pH 7.0 mit 1 N HCl eingestellt und die Lösung auf 1000 ml aufgefüllt.

**T3 RNA Polymerase 10x Puffer** (Roche)

Tris/HCl	pH 8.0	0.4	M
MgCl <sub>2</sub>		60	mM
Dithiothreitol		100	mM
Spermidine		20	mM

**T7 RNA Polymerase 10x Puffer** (Roche, Transkriptionskit Lösung 8)**10x TBE Puffer**

Zusammensetzung:

Trizma Base	1,0	M	(Sigma)
Borsäure	0,83	M	(Merck)
EDTA	0,01	M	(Sigma)

Die Reagenzien werden eingewogen und in aqua dest. gelöst. Eine pH-Wert Einstellung ist nicht erforderlich.

**TNB Blockungspuffer** (NEN)Der TNB Blockungspuffer aus dem TSA<sup>TM</sup> Biotin System Kit enthält

TrisHCl ph 7.5	0,1	M
NaCl	0,15	M
Blockungsreagenz	0,5 %	

**Tris-Puffer (Trishydroxymethylaminomethan)**

Synonym wird auch die Bezeichnung Tris/HCl verwendet. Der Zusatz HCl bei der Namensgebung berücksichtigt, dass der pH Wert mittels Salzsäure eingestellt wird.

Zusammensetzung:

Trizma Base	2,0	M	(Sigma)
-------------	-----	---	---------

welches in aqua dest. gelöst und mit HCl auf den gewünschten pH 7.5, pH 8.0 bzw 9.5 titriert wird.

**Tris/HCl/EDTA**

Zusammensetzung:

Tris/HCl	pH 8.0	0,05	M	(Sigma)
EDTA	pH 8.0	0,005	M	(Sigma)

Ausgehend von einer 1 M Tris/HCl Stammlösung mit pH 8.0 wird ein 1:20 verdünnte Pufferlösung mit einer 0,05 M Konzentration hergestellt. Zudem wird diese Lösung mit einer 1:100 verdünnten 0,5 M EDTA Stocklösung mit pH 8.0 versetzt.

**Lösungen****1% Blockungsreagenz** (Roche)

Abhängig vom verwendeten Waschpuffer des jeweiligen Versuchprotokolls wird das Blockungsreagenz 1%ig in 1x Maleinsäurepuffer oder 1x Dig 1 Puffer eingewogen und gelöst.

**50% Dextransulfat** (Amersham Pharmacia Biotech AB)

Dextransulfat wird 50%ig in A. dest. steril reinst (z.B. Ampuwa) eingewogen und im Wasserbad bei 60°C über Nacht in einem reduzierten Volumen gelöst. Bei vollständiger Lösung wird das fehlende Volumen zugesetzt.

**Chemikalien**

Acetic Anhydrid	(Sigma)
Aceton	(Merck)
Agarose	(Sigma)
Ampuva H <sub>2</sub> O	(Fresenius Kabi)
Chloroform	(Merck)
Dextransulfat	(Amersham Pharmacia Biotech AB)
Diethyl Pyrocarbonate DEPC	(Sigma)
Dithiothreitol DTT	(Sigma)
Ethanol	(Merck)
EDTA	(Sigma)
Fixogum Rubber Cement	(Marabu)
Formaldehyd	(Sigma)
Glycin	(Serca)
HCl 1N	(Merck)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	(Merck)
Isopropanol	(Merck)
Methanol	(Merck)
Natriumacetat	(Merck)
Paraformaldehyd	(Serva)
Triethanolamin	(Sigma)
Silan (3-Triethoxysilypropylamin)	(Merck)
Xylol	(Merck)

**Substrate**Substrate für das Enzym **Peroxidase**

<b>DAB</b>	(DAKO)
<b>AEC</b>	(DAKO)

Substrate für das Enzym **alkalische Phosphatase**

<b>Neufuchsin</b>	(DAKO)
<b>NBT/BCIP</b>	(Roche)

Substrat für die **RNA Polymerase**

<b>ATP</b>	(Roche, Transkriptionskit SP6/T7 999644)
<b>CTP</b>	(Roche, Transkriptionskit SP6/T7 999644)
<b>Digoxigenin-11-UTP (Dig-11-UTP)</b>	(Roche)

<b>GTP</b>	(Roche, Transkriptionskit SP6/T7 999644)
<b>UTP</b>	(Roche, Transkriptionskit SP6/T7 999644)

## Enzyme

<b>DNase</b>	(Roche, Transkriptionskit SP6/T7 999644)
--------------	--

<b>Proteinase K</b>	(Sigma)
---------------------	---------

<b>Pronase</b>	(Sigma)
----------------	---------

Pronase bezeichnet die Protease Typ XXIV und wird bakteriell kristallisiert als Lyophilisat von Sigma vertrieben. Zur Herstellung einer 5% Stammlösung werden 1g Lyophilisat in 20ml aqua dest. resuspendiert.

<b>Restriktionsenzym <i>BamH</i> 1:</b>	(invitrogen)
---	--------------

*BamH* 1 ist ein Restriktionsenzym isoliert aus *Bacillus amyloliquefaciens* H. Die Stammlösung hat eine Konzentration von 10 U/μl. Eine Unit ist die Menge an Enzym, die 1 μg DNA in einer Stunde bei 37°C im geeigneten Puffer (Tris-HCl (pH 8,0) 50mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, NaCl 100 mM) schneidet.

<b>Restriktionsenzym <i>EcoR</i> 1</b>	(invitrogen)
--	--------------

*EcoR* 1 ist ein Restriktionsenzym isoliert aus *E coli* RY13. Die Stammlösung hat eine Konzentration von 10 U/μl. Eine Unit ist die Menge an Enzym, die 1 μg DNA in einer Stunde bei 37°C im geeigneten Puffer (Tris-HCl (pH 8,0) 50mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, NaCl 100 mM) schneidet .

<b>Restriktionsenzym <i>Hind</i> III:</b>	(invitrogen)
---	--------------

Das Restriktionsenzym *Hind* III wird aus *haemophilus influenzae* R<sub>d</sub> isoliert. Die Enzymkonzentration beträgt 10 U/μl. 1 Unit Enzym ist erforderlich um 1 μg DNA im geeigneten Puffer (Tris-HCl (pH 8,0) 50mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, NaCl 50 mM) bei 37°C innerhalb einer Stunde zu schneiden.

<b>RNase A</b>	(Roche)
----------------	---------

<b>RNase Inhibitor</b>	(Roche, Transkriptionskit Lösung 10)
------------------------	--------------------------------------

<b>SP6 / T7 Transkriptions Kit</b>	(Roche)
------------------------------------	---------

Verwendung der T7 RNA Polymerase (Lösung 12)

<b>T3 RNA Polymerase</b>	(Roche)
--------------------------	---------

## Gegenfärbungen

Methylgrün	(DAKO)
------------	--------

Mayers Hämalaun	(Merck)
-----------------	---------

## Eindeckmedien

Aqua tex.	(Merck)
-----------	---------

DAKO Faramount	(DAKO)
----------------	--------

Kaisers Glyceringelatine	(Merck)
--------------------------	---------

Vectorshield mouting medium	(VEKTOR)
-----------------------------	----------

## Großgeräte

Feinwaage, feuchte Kammer, Heizplatte (37°C-80°C), Heizblock (105°C), Kühlschrank 4°C, Lichtmikroskop (Zeiss, Hellfeldmikroskopie 10x, 40x, 100x Objektiv), Mikrowelle, Tiefkühlschrank (-20°C bzw -70°C), Kühlzentrifuge, Mikrowelle, Tischzentrifuge, Vortex-Gerät, Wasserbad (37°C-80°C), Wärmeschrank (37°)

## Antikörper, Plasmide und Sonden

### unkonjugierte Antikörper

<b>mouse-anti-Biotin Antikörper</b>	(DAKO, Best-Nr. M 743)
<b>mouse-anti-CD3 Antikörper</b> (Klon PS1)	(Novocastra, Best-Nr. NCL-CD3-PS1)
<b>mouse-anti-CD20 Antikörper</b> (Klon L26)	(DAKO, Best-Nr. CD20cy)
<b>mouse-anti-CMV Antikörper</b> (Klon CCH2)	(DAKO, Best-Nr. M 0757)
<b>mouse-anti-EBV-LMP Antikörper</b> (KlonCS1-4)	(DAKO, Best-Nr. M 0817)
<b>mouse-anti-Parvo B19 VP1/VP2 AK</b> Probenkonzentration [14,43 mg/ml] (Antigen Parvo B19 V93/7 Parvo pSEM VPB1 Antigenkonzentration [1,3 mg/ml])	(Dade Behring, Marburg nicht kommerziell zu erwerben; von Dr. Fischer u Dr. Beschle überlassen)
<b>mouse-anti-ZEBRA Antikörper (anti-BZLF1)</b>	(DAKO, Best-Nr. M 7005)
<b>rabbit-anti-mouse Antikörper</b>	(DAKO, Best-Nr. Z 0109)
<b>rat-anti-EBNA Antikörper</b>	(nicht kommerziell erhältlicher Ak, freundlicherweise von Prof. Grässer; Institut für Virologie der Universität des Saarlandes zur Verfügung gestellt)

### konjugierter Antikörper

<b>anti-Digoxigenin/alk. Phosphatase konj. AK</b>	(Roche, Best-Nr. 1093274)
<b>anti-Digoxigenin / Peroxidase konjugierter AK</b>	(Roche, Best-Nr. 1207733)
<b>goat-anti-rat / Peroxidase konjugierter AK</b>	(Imgenex, Best-Nr. 20201)
<b>rabbit-anti-mouse IgG biotinyliert</b>	(DAKO, Best-Nr. E 0413)
<b>swine-anti-rabbit IgG biotinyliert</b>	(DAKO, Best-Nr. E 0353)

### Verstärkungssysteme

<b>APAAP mouse</b>	(DAKO, Best-Nr. D 0651)
<b>AB-Komplex (ABC)/HRP</b>	(DAKO, Best-Nr. K 0355)
<b>Streptavidin/HRP</b>	(DAKO, Best-Nr. P 0397)
<b>TSA<sup>TM</sup> Biotin System</b> der Tyraminverstärkungskit enthält - Streptavidin/HRP - biotinyliertes Tyramin - TNB Blockungspuffer	(NEN Life Science Products)

### EBER Plasmide (bereitgestellt vom Institut für Virologie der Universität des Saarlandes)

#### Transkriptionsvektor mit inserierter EBER 1 cDNA

Plasmidname: pBSJJ1,  
Plasmidgröße: 3,51 kb  
hergestellt von: Louise Brooks (1991)  
Bemerkung: das klonierte EBER 1 cDNA-Fragment ist flankiert von EcoR1 und Hind III Schnittstellen  
Konzentration: 5,8 µg/µl

#### Transkriptionsvektor mit inserierter EBER 2 cDNA

Plasmidname: pBSJJ2,  
Plasmidgröße: 3,46 kb  
hergestellt von: Louise Brooks (1991)  
Bemerkung: das klonierte EBER 2 cDNA-Fragment ist flankiert von EcoR1 und BamH1 Restriktionsenzymstellen.  
Konzentration: 2,9 µg/µl

**CMV-pp65 DNA-Plasmid**

(bereitgestellt von PD Dr. M. Sester,  
Innere Medizin, Universität des Saarlandes)

**DNA-Sonden und Carrier DNA bzw. RNA****CMV-DNA Bio. Probe**

biotinylierte CMV-DNA Sonde mit einer

a) Sondenkonzentration [60µg/ml]

b) Sondenkonzentration [20µg/ml]

(Enzo Diagnostics)

**Carrier DNA und RNA****herring sperm DNA**

DNA Konzentration [10mg/ml]

(Promega)

**total yeast RNA**

RNA Konzentration [ 5mg/ml]

**t-RNA**

RNA Konzentration [10mg/ml]

**Seren****bovine serum Albumin (BSA)**

(Sigma)

**Humanserum AB**

eigene Präparation

(aus AB-Blutgruppen Spendern)

**rabbit Normalserum**

(DAKO, Best-Nr. X 0902)

**swine Normalserum**

(DAKO, Best-Nr. X 0901)

**Chromogen**

AEC Substrat kit

(DAKO, Best-Nr. K 3461)

BCIP/NBT substrate Kit

(VEKTOR, Best-Nr. SK 5400)

DAB Plus-Substratlösung

(DAKO, Best-Nr. K 3467)

Fuchsin Substrat System

(DAKO, Best-Nr. K 0624)

## Protokollchemata

### Herstellung der EBER I / II RNA Sonde:

#### Kurzschema A

Je nach Auswahl der Restriktionsendonuklease sowie des Ausgangsplasmids wird ein Template zur Synthese von EBER I sense (A1) oder antisense (A2), sowie EBER II sense (A3) oder antisense (A4) erzeugt. Beachte RNase freies Arbeiten!

#### LINEARISIERUNG

1) Pipettierschema für 4 Reaktionsansätze zur Linearisierung der EBER Plasmide

Reaktionsansatz A1 <b>EBER 1 / <i>EcoR</i> 1</b> Sense-Synthese		Reaktionsansatz A2 <b>EBER 1 / <i>Hind</i> III</b> Antisense-Synthese	
2 µg DNA (EBER 1)	1,38 µl	2 µg DNA (EBER 1)	1,38 µl
pBSJ11 [1,45 µg/µl]		pBSJ11 [1,45 µg/µl]	
3 x 5 U <i>EcoR</i> 1 [10 U/µl]	1,5 µl	3 x 5 U <i>Hind</i> III	1,5 µl
10 x Puffer React 3	10,00 µl	10 x Puffer React 2	10,00 µl
Ampuwa Wasser	87,10 µl	Ampuwa Wasser	87,10 µl
Σ 100,0 µl		Σ 100,0 µl	

Reaktionsansatz A3 <b>EBER 2 / <i>EcoR</i> 1</b> Sense-Synthese		Reaktionsansatz A4 <b>EBER 2 / <i>Bam</i>H 1</b> Antisense-Synthese	
2 µg DNA (EBER 2)	2,0 µl	2 µg DNA (EBER 2)	2,0 µl
pBSJ12 [1,0 µg/µl]		pBSJ12 [1,0 µg/µl]	
3 x 5 U <i>EcoR</i> 1 [10 U/µl]	1,5 µl	3 x 5 U <i>Bam</i> H 1	1,5 µl
10 x Puffer React 3	10,00 µl	10 x Puffer React 3	10,00 µl
Ampuwa Wasser	86,50 µl	Ampuwa Wasser	86,50 µl
Σ 100,0 µl		Σ 100,0 µl	



## TRANSKRIPTION

Verwendung einer T3- und einer T7- RNA Polymerase in Gegenwart der benötigten Nukleotid-Bausteine (NTP), sowie Digoxigenin-11-UTP zur nicht radioaktiven Markierung als Sonden.

## 1) Herstellung der NTP-Mischung ATP, GTP, CTP im Verhältnis 1 : 1 : 1

Pro Reaktionsansatz werden 2 µl jedes Nukleotides eingesetzt

4 x 2 µl ATP	∑ 8 µl
4 x 2 µl GTP	∑ 8 µl
4 x 2 µl CTP	∑ 8 µl
<hr/>	
	∑ 24 µl

## 2) Herstellung einer UTP / Digoxigenin-11-UTP Mischung im Verhältnis 2 : 1

4 x 1,3 µl UTP	∑ 5,2 µl
4 x 0,7 µl Dig-11-UTP	∑ 2,8 µl
<hr/>	
	∑ 8,0 µl

pro Reaktionsansatz wird 1 µg DNA-Template eingesetzt.

## 3) Transkription Pipettierschema für die Reaktionsansätze (A1 – A4)

Reaktionsansatz A1 <b>EBER 1 / <i>EcoR</i> 1</b>		Reaktionsansatz A2 <b>EBER 1 / <i>Hind</i> III</b>	
<b>Sense-Synthese (EBER 1)</b>		<b>Antisense-Synthese (EBER 1)</b>	
DNA (~ 1 µg)	5 µl	DNA (~ 1 µg)	5 µl
NTP-Gemisch	6 µl	NTP-Gemisch	6 µl
UTP / Dig-11-UTP-Gemisch	2 µl	UTP / Dig-11-UTP-Gemisch	2 µl
T3 10 x Puffer	2 µl	T7 10 x Puffer	2 µl
RNase Inhibitor	1 µl	RNase Inhibitor	1 µl
Ampuwa Wasser	2 µl	Ampuwa Wasser	2 µl
<b>T3 RNA Polymerase</b>	2 µl	<b>T7 RNA Polymerase</b>	2 µl
<hr/>		<hr/>	
∑ 20 µl		∑ 20 µl	

Reaktionsansatz A3 <b>EBER 2 / <i>EcoR</i> 1</b>		Reaktionsansatz A4 <b>EBER 2 / <i>BamH</i> 1</b>	
Sense-Synthese (EBER 2)		Antisense-Synthese (EBER 2)	
DNA (~ 1 µg)	5 µl	DNA (~ 1 µg)	5 µl
NTP-Gemisch	6 µl	NTP-Gemisch	6 µl
UTP / Dig-11-UTP-Gemisch	2 µl	UTP / Dig-11-UTP-Gemisch	2 µl
T7 10 x Puffer	2 µl	T3 10 x Puffer	2 µl
RNase Inhibitor	1 µl	RNase Inhibitor	1 µl
Ampuwa Wasser	2 µl	Ampuwa Wasser	2 µl
<b>T7 RNA Polymerase</b>	2 µl	<b>T3 RNA Polymerase</b>	2 µl
$\Sigma$ 20 µl		$\Sigma$ 20 µl	

- 4) die Reaktionsgefäße inkubieren für **2 h** bei 37 °C
- 5) Zusatz von 2 µl DNase für **15 min** 37 °C
- Abstoppen der Transkription durch
- 6) Zusatz von 2 µl 0,2 mM EDTA pH 8.0
- 7) Erhitzen **10 min** 65° C

- Bestimmung der Transkriptkonzentration mittels Gelelektrophorese -

***In situ* Hybridisierung (ISH)****EBER - Protokoll: RNA *in situ* Hybridisierung (EBER - ISH)****Kurzschema B**

B1 Farbsubstrat Neufuchsin

B2 Farbsubstrat NBT/BCIP

B3 Farbsubstrat DAB

## TAG I

---

ENTPARAFFINIERUNG	1) Xylol	<b>2x</b>	<b>5</b> min	RT
REHYDRIERUNG	2) Ethanol absolut	<b>2x</b>	<b>5</b> min	RT
	3) 95 % Ethanol		<b>3</b> min	RT
	4) 80 % Ethanol		<b>3</b> min	RT
	5) 0,2 N HCl		<b>20</b> min	RT
	6) DEPC-H <sub>2</sub> O		waschen	RT
	7) DEPC-H <sub>2</sub> O		<b>5</b> min	RT
	8) TrisHCl / EDTA		waschen	RT
ENZYMANDAU	9) Proteinase K in TrisHCl / EDTA		<b>20</b> min	RT
	[30 µg/ml], 100 µl / OT auftragen,			
	die Enzymlösung wird 10 min vorgewärmt			
	10) 1x PBS		waschen	RT
	11) 0,2 % Glycin in PBS		<b>5</b> min	RT
	12) 1x PBS		<b>5</b> min	RT
	13) 4 % Paraformaldehyd in 1x PBS		<b>20</b> min	RT
	14) 1x PBS		waschen	RT
	15) 0,25 % Acetic Anhydrid in		<b>10</b> min	RT
	0,1 M Triethanolamin, im Plastiktube			

	16)	1x PBS	5 min	RT
DEHYDRIERUNG	17)	80 % Ethanol	5 min	RT
	18)	95 % Ethanol	5 min	RT
	19)	Lufttrocknen	~1 h	RT
HYBRIDMIX/ SONDENGEMISCH*	20)	~100 µl Hybridmix-Sondengemisch / OT auftragen		
	21)	RNase-freies Deckglas aufbringen		
HYBRIDISIERUNG	22)	in feuchter Kammer (6x SSC befeuchtet)	<b>über Nacht</b>	50°C

---

\* Anmerkung zu Hybridmix/Sondengemisch:

Pipettierschema zur Herstellung des Hybridmix/Sondengemisches für 5 OT (~500µl)

HYBRIDMIX -	1)	250	µl	100% Formamid deionisiert			
PIPETTIERSHEMA	2)	125	µl	50 % Dextransulfat			
	3)	62,5	µl	20x SSC			
	4)	12,5	µl	total yeast RNA [5 µg/µl]			
	5)	12,5	µl	t-RNA [10 µg/µl]			
	6)	6,25	µl	herring sperm DNA [10 µl/µl]			
<hr/>							
	7)	Ansatz mischen					
	8)	im Heizblock inkubieren	10 min	105°C			
	9)	nach Abkühlen auf Raumtemperatur					
		Zugabe von 5 µl	1 M DTT			RT	

SONDENGEMISCH - PIPETTIERSHEMA	1) 5,0 µl DEPC-H <sub>2</sub> O		
	2) 0,2 µl Antisense EBER-1 (min. 40 ng/OT)		
	3) 0,2 µl Antisense EBER-2 (min. 40 ng/OT)		
<hr/>			
	4) Ansatz mischen		
	5) im Wasserbad erhitzen	10 min	80°C
	6) Hybridmix zugeben und mischen		
	7) auftragen von ~100 µl dieses Hybridmix- Sondengemisches pro OT		
	- bis hier RNase-frei arbeiten -		

## TAG II

DETEKTION	1) Deckgläser in 4x SSC ablösen	3 min	RT
<b>B.1</b>	2) NET-Puffer	10 min	37°C
	3) RNase in 1x NET [20 µg/ml]	30 min	37°C
	4) 1x NET	waschen	37°C
	5) 2x SSC	15 min	45°C
	6) 2x SSC	45 min	45°C
	7) Dig 1	10 min	RT
	8) 1 % Boe/Ma Blockungsreagenz in Dig 1 (~ 100 µl/OT auftragen)	30 min	RT
	9) Anti Digoxigenin/alk. Phosphase konjugierter Ak [1 : 300] in Blockungsreagenz (~ 100 µl/OT auftragen)	30 min	RT
	10) Dig 1	2x 10 min	RT

**B.2** wie Protokoll A.1, aber vor Auftragen des Farbsubstrats muss eine Äquilibrierung mit Dig 3 Puffer erfolgen.

11) Dig 3 5 min RT

**B.3** Beachte: beim Einsetzen eines mit Peroxidase-konjugierten Antikörpers, muss die endogene Peroxidase gehemmt werden.

7a) 7b) und 7c) Einschub in das Versuchsprotokoll ab Punkt 7) am Tag I

7a) 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in DEPC-H<sub>2</sub>O 5 min RT

7b) DEPC-H<sub>2</sub>O waschen RT

7c) DEPC-H<sub>2</sub>O 5 min RT

anderer Detektionsantikörper ersetzt Punkt 9) des Versuchsprotokolls am Tag II

9) Anti Digoxigenin/**Peroxidase** 30 min RT  
 konjugierter Ak  
 [1 : 100] in Blockungsreagenz  
 (~ 100 µl/OT auftragen)

## FÄRBUNG

B.1 **Neufuchsin** Substratsystem: nach Kitvorschrift

B.2 **NBT/BCIP**: nach Kitvorschrift

B.3 **DAB**: nach Kitvorschrift

## EINDECKEN

wässriges Eindeckmittel

(Glyzeringelatine, aqua tex., Dako Faramount)

**CMV Protokoll: DNA *in situ* Hybridisierung mit APAAP Verstärkungssystem****Kurzschema C**

C1 Heizplattendennaturierung

C2 Mikrowellenbehandlung

## TAG I

ENTPARAFFINIEREN	1) Xylol	2x	10 min	RT
	2) Isopropanol	2x	5 min	RT
	3) 90 % Ethanol		5 min	RT
	4) 70 % Ethanol		5 min	RT
REHYDRIERUNG	5) 1x PBS	3x	5 min	RT
ENZYMANDAU	6) 0,1 % Pronase in 1x PBS			
	<b>C.1</b> Fall-OT		6 min	RT
	<b>C.2</b> Fall-OT		5 min	RT
	7) 1x PBS	3x	5 min	RT
HYBRIDMIX/*	8) ~ 20 µl Hybridmix-Sondengemisch / OT auftragen			
SONDENGEMISCH	(ca. 75 ng DNA Sonde/OT)			
	9) Deckglas aufbringen			
DENATURIERUNG				
<b>C.1</b>	10a) Deckglas mit Fixogum umkleben und			
	10b) zum Trocknen für		10 min	37°C
	10c) auf der Heizplatte		10 min	80°C
<b>C.2</b>	10a) in der Mikrowelle, Box luftdicht verschließen			
	10b) Stufe 450 W		2 min	
	10c) Stufe 150 W		6 min	
	10d) abkühlen lassen, Box auf Eis stellen			
HYBRIDISIERUNG	11) in feuchter Kammer		<b>über Nacht</b>	42°C

\* Anmerkung zu Hybridmix/Sondengemisch:

Pipettierschema zur Herstellung des Hybridmix/Sondengemisches für 1 OT (~20 µl)

HYBRIDMIX -	1)	100 % Formamid deion.	8,4 µl
SONDENGEMISCH	2)	DNA-ISH Puffer	8,4 µl
	3)	10x carrier DNA [10 µg/µl]	0,2 µl
	4)	CMV Bio Probe [25 ng/µl]	3,0 µl

## TAG II

DETEKTION	1)	Deckgläser in PBS ablösen			
Waschung	2)	1x PBS	<b>3x</b>	<b>5 min</b>	RT
1. Antikörper	3)	mouse-anti-Biotin Ak [1 : 100] in 1 % BSA/PBS (~ 100 µl/OT auftragen)		<b>1 h</b>	RT
Waschung	4)	1x PBS	<b>3x</b>	<b>5 min</b>	RT
2. Antikörper	5)	rabbit-anti-mouse Ak [1 : 30] in 20 % Humanserum/PBS (~ 100 µl/OT auftragen)		<b>30 min</b>	RT
Waschung	6)	1x PBS	<b>3x</b>	<b>5 min</b>	RT
3. Antikörper	7)	mouse-APAAP [1 : 50] in PBS (~ 100µl/OT auftragen)		<b>30 min</b>	RT
FÄRBUNG		Neufuchsin bzw. NBT/BCIP Substrasystem:			nach Kitvorschrift
EINDECKEN		wässriges Eindeckmittel (aqua tex.)			

## CMV Protokoll: DNA *in situ* Hybridisierung mit Tyramin-Verstärkungsschritt Kurzschema D

### TAG I

identische Behandlung wie TAG I unter Kurzschema C.1  
(Heizplattendeneraturierung) beschrieben

lediglich endogene Peroxidase muss gehemmt werden, da  
die Aktivierung und die kovalenten Bindungen der  
biotinylierten Tyramide durch HRP katalysiert werden.

Einschub in das Versuchsprotokoll ab Punkt 5) am Tag I

- |     |  |         |    |
|-----|--|---------|----|
| 5a) | 3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in DEPC-H <sub>2</sub> O | 5 min   | RT |
| 5b) | DEPC-H <sub>2</sub> O                                      | waschen | RT |
| 5c) | DEPC-H <sub>2</sub> O                                      | 5 min   | RT |

### TAG II Verwendung des TSA<sup>TM</sup> Biotin System (NEN Life Science Products)

#### BLOCKUNG

- |    |   |          |    |
|----|---|----------|----|
| 1) | TNB-Blockungspuffer   | 30 min   | RT |
| 2) | Streptavidin/HRP (DAKO)<br>[1 :100] in 1 % BSA/PBS                    | 1 h      | RT |
| 3) | 1x PBS  | 3x 5 min | RT |
| 4) | biotinyliertes Tyramin (NEN-Kit)<br>[1 : 50] in amplification diluent | 9-10min  | RT |
| 5) | 1x PBS  | 3x 5 min | RT |
| 6) | Sreptavidin/HRP (NEN-KiT)   | 30 min   | RT |
| 7) | 1x PBS  | 3x 5 min | RT |

#### FÄRBUNG

- |    |                                |        |    |
|----|--------------------------------|--------|----|
| 8) | <b>DAB:</b> nach Kitvorschrift | 25 min | RT |
| 9) | stop in aqua dest.             |        |    |

#### EINDECKEN

- |     |                                     |  |  |
|-----|-------------------------------------|--|--|
| 10) | wässriges Eindeckmittel (aqua tex.) |  |  |
|-----|-------------------------------------|--|--|

## Immunhistochemie (IHC)

### Protokoll zur Detektion von Parvovirus B19 VP1 und VP2 mittels IHC in APAAP Färbetechnik

#### Kurzschema E.1

ENTPARAFFINIERUNG	1)	Xylol	<b>2x</b>	<b>10</b> min	RT
	2)	Isopropanol	<b>2x</b>	<b>5</b> min	RT
	3)	90 % Ethanol		<b>5</b> min	RT
	4)	70 % Ethanol		<b>5</b> min	RT
REHYDRIERUNG	5)	aqua dest.		<b>5</b> min	RT
	6)	1x PBS	<b>4x</b>	<b>5</b> min	RT
ENZYMANDAU	7)	0,1 % Pronase in 1x PBS		<b>7</b> min	RT
		die Enzymlösung wird 10 min vorgewärmt			
WASCHUNG	8)	1x PBS	<b>3x</b>	<b>5</b> min	RT
1 ANTIKÖRPER	9)	mouse-anti-Parvo B19 VP1/VP2		<b>60</b> min	RT
		[1 : 100] in 1 % BSA/PBS (~ 100 µl/OT auftragen)			
WASCHUNG	10)	1x PBS	<b>3x</b>	<b>5</b> min	RT
2. ANTIKÖRPER	11)	rabbit-anti-mouse Ak		<b>30</b> min	RT
		[1 : 30] in 20 % Humanserum/PBS (~ 100 µl/OT auftragen)			
WASCHUNG	12)	1x PBS	<b>3x</b>	<b>5</b> min	RT
3. Antikörper	13)	mouse-APAAP		<b>30</b> min	RT
		[1 : 50] in PBS (~ 100µl/OT auftragen)			
WASCHUNG	14)	1x PBS	<b>3x</b>	<b>5</b> min	RT
FÄRBUNG	15)	<b>NBT/BCIP:</b> nach Kitvorschrift			
EINDECKEN		wässriges Eindeckmittel (aqua tex.)			

## Protokoll zur Detektion anderer viraler Epitope (CMV EA, EBV LMP, HSV 1) mittels IHC in ABC Technik

### Kurzschema F

**F.1** CMV-early antigen (EA)

**F.2** EBV-latent menbrane Protein (LMP)

---

ENTPARAFFINIEREN	1) Xylol	<b>3x</b>	<b>10</b> min	RT
	2) Ethanol absolut	<b>2x</b>	<b>5</b> min	RT
	3) 95 % Ethanol		<b>5</b> min	RT
	4) 80 % Ethanol		<b>5</b> min	RT
REHYDRIEREN	5) aqua dest.		<b>5</b> min	RT
	6) 1x PBS		<b>5</b> min	RT
ENZYMANDAU	7) 1 % Pronase in 1x PBS		<b>1-2</b> min	37°C
	die Enzymlösung wird 10 min vorgewärmt			
BLOCKUNG DER END. PEROXIDASE	8) mit kaltem Leitungswasser spülen			
	9) 30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [1 : 25] in aqua dest.		<b>25</b> min	RT
	10) in fließendem Leitungswasser spülen			
BLOCKUNG	11) 1x PBS			RT
	je nach verwendetem Sekundärantikörper wird mit entsprechendem Normalserum geblockt			
	<b>F.1</b>	12) Blockung mit 20 % rabbit Normalserum		
<b>F.2</b>	12) Blockung mit 20 % rabbit Normalserum			
	13) Serumblockung abkippen, nicht abspülen			

## 1. ANTIKÖRPER

**F.1** 14) mouse-anti-CMV EA-Antikörper 1 h 37°C  
 [1 : 50] in 1x PBS  
 100 µl – 200 µl auftragen

**F.2** 14) mouse-anti-EBV-LMP Antikörper 1 h 37°C  
 [1 : 20] in 1x PBS  
 100 µl – 200 µl auftragen

15) 1x PBS 2x 5 min RT

## 2. ANTIKÖRPER

(biotinyliert)

**F.1** 16) rabbit-anti-mouse IgG bio. 30 min RT  
 [1 : 200] in 1x PBS

**F.2** 16) rabbit-anti-mouse IgG bio. 30 min RT  
 [1 : 200] in 1x PBS

17) 1x PBS 2x 5 min RT

ABC 18) AB Complex (HRP konjugiert) 30 min RT  
 nach Dako Kitvorschrift (Dako Nr. K 0355)

1 Teil A + 1 Teil B + 100 Teile 1x PBS

200 µl / OT auftragen

(Beachte: ABC Reifezeit 30 min, vorzeitig ansetzen)

19) 1x PBS 2x 5 min RT

## FÄRBUNG

20) AEC Substratsystem nach Kitvorschrift

21) stop in 1x PBS

22) umpuffern in aqua dest.

## KERNFÄRBUNG

23) Hämalaun 20 min RT

24) Bläuen in Leitungswasser 5 min RT

## EINDECKEN

25) Kaisers Glyceringelatine

**Protokoll zur Detektion des EBV-ZEBRA (=BZLF 1) Antigens mittels IHC in ABC Technik und Tyraminverstärkungstechnik.**

**Kurzschema G**

ENTPARAFFINIEREN	1) Xylol	<b>3x</b>	<b>10</b> min	RT
	2) Ethanol absolut	<b>2x</b>	<b>5</b> min	RT
	3) 95 % Ethanol		<b>5</b> min	RT
	4) 80 % Ethanol		<b>5</b> min	RT
REHYDRIEREN	5) aqua dest.		<b>5</b> min	RT
	6) 1x PBS		<b>5</b> min	RT
ENZYMANDAU	7) 1 % Pronase in 1x PBS		<b>1-2</b> min	37°C
	die Enzymlösung wird 10 min vorgewärmt			
BLOCKUNG DER END. PEROXIDASE	8) mit kaltem Leitungswasser spülen			
	9) 30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [1 : 25] in aqua dest.		<b>25</b> min	RT
	10) in fließendem Leitungswasser spülen			
BLOCKUNG	11) 1x PBS			RT
	12) Blockung mit 20 % rabbit Normalserum			
1. ANTIKÖRPER	13) Serumblockung abkippen, nicht abspülen			
	14) mouse-anti-ZEBRA Antikörper (mouse-anti-BZLF 1 Antikörper) [1 : 400] in 1x PBS		<b>1</b> h	37°C
2. ANTIKÖRPER	15) 1x PBS	<b>2x</b>	<b>5</b> min	RT
	16) rabbit-anti-mouse IgG bio. [1 : 200] in 1x PBS		<b>30</b> min	RT
ABC	17) 1x PBS	<b>2x</b>	<b>5</b> min	RT
	18) AB Complex (HRP konjugiert)		<b>30</b> min	RT

nach Dako Kitvorschrift (Dako Nr. K 0355)

1 Teil A + 1 Teil B + 100 Teile 1x PBS

200 µl / OT auftragen

(Beachte: ABC Reifezeit 30 min, vorzeitig ansetzen)

	19)	1x PBS	<b>2x</b>	<b>5</b> min	RT
TYRAMIN VERSTÄRKUNG	20)	100–200µl bio. Tyramin Lsg/OT	<b>10</b>	min	RT
		Ansatz von 1 ml bio. Tyramin Lösung			
		( 5 µl bio. Tyramin			
		+ 3 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)			
		+ 992 µl 1x PBS)			
	21)	1x PBS		<b>5</b> min	RT
	22)	AB Complex (HRP konjugiert)		<b>20</b> min	RT
	23)	1x PBS		<b>5</b> min	RT
DAB-FÄRBUNG	24)	DAB Entwicklung		<b>20</b> min	RT
	25)	stop in 1x PBS			
	26)	umpuffern in aqua dest.			
KERNFÄRBUNG	27)	Hämalaun		<b>20</b> min	RT
	28)	Bläuen in Leitungswasser		<b>5</b> min	RT
EINDECKEN	29)	Kaisers Glyceringelatine			

**Protokoll zur Detektion des Epstein-Barr nuclear antigen (EBNA) mittels IHC in ABC Technik und Tyraminverstärkungstechnik.**

**Kurzschema H**

ENTPARAFFINIEREN	1) Xylol	<b>3x</b>	<b>10</b>	min	RT
	2) Isopropylalkohol	<b>2x</b>	<b>5</b>	min	RT
	3) 90 % Ethanol		<b>5</b>	min	RT
	4) 70 % Ethanol		<b>5</b>	min	RT
REHYDRIEREN	5) aqua dest.		<b>5</b>	min	RT
BLOCKUNG DER END. PEROXIDASE	9) 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in aqua dest.		<b>5</b>	min	RT
	6) aqua dest.		<b>5</b>	min	RT
	7) 1x PBS	<b>3x</b>	<b>5</b>	min	RT
	8) aqua dest.		<b>5</b>	min	RT
MIKROWELLEN- BEHANDLUNG	9a) in Becherglas mit 1l 1x Citratpuffer pH 6.0 OT mit Plastik-Rack einstellen				
	9b) erhitzen bei 700 W		<b>10 – 20</b>	min	
	9c) anschließend sprudelnd kochen		<b>10</b>	min	
	9d) in Citratpuffer abkühlen lassen		<b>15</b>	min	
	10) aqua dest.		<b>5</b>	min	RT
	11) 1x PBS	<b>3x</b>	<b>5</b>	min	RT
1. ANTIKÖRPER	12) rat-anti-EBNA Antikörper [1 : 10] in 1x PSA/PBS		<b>1</b>	h	37°C
	13) 1x PBS	<b>3x</b>	<b>5</b>	min	RT
2. ANTIKÖRPER	14) goat-anti-rat IgG/Peroxidase [1 : 150] in 1x BSA/PBS		<b>30</b>	min	RT
	15) 1x PBS	<b>3x</b>	<b>5</b>	min	RT

---

TYRAMIN VERSTÄRKUNG	16)	200µl bio. Tyramin / pro OT	<b>10</b>	min	RT
		Ansatz von 1 ml bio. Tyramin Lösung ( 5 µl bio. Tyramin + 3 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%) + 992 µl 1x PBS)			
	17)	1x PBS	<b>3x</b>	<b>5</b>	min RT
ABC	18)	AB Complex (HRP konjugiert)	<b>30</b>	min	RT
		nach Dako Kitvorschrift (Dako Nr. K 0355) 1 Teil A (Avidin) + 1 Teil B (HRP bio.) + 100 Teile 1x PBS, jeweils 200 µl / OT auftragen (Beachte: ABC Reifezeit 30 min, vorzeitig ansetzen)			
	19)	1x PBS	<b>3x</b>	<b>5</b>	min RT
DAB-FÄRBUNG	20)	DAB Entwicklung	<b>20</b>	min	RT
	21)	stopp in 1x PBS			
	22)	umpuffern in aqua dest.			
EINDECKEN	23)	Kaisers Glyceringelatine			