

Aus dem Max-von-Pettenkofer Institut, Lehrstuhl Virologie
Direktor: Prof. Dr.med. Ulrich Koszinowski

Bestimmung der Viruslast des Humanen Herpesvirus 8 mittels quantitativer Polymerase- Kettenreaktion

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Dušan Prevalšek

aus
Jesenice

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr.med. Dr.rer.nat. J. Haas
Max-von-Pettenkofer Institut für Virologie

Mitberichterstatter: Prof. Dr.med. F.-D. Goebel
Prof. Dr.med. J. Prinz

Dekan: Prof. Dr.med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.2005

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	1
2	Einleitung	5
2.1	Humanes Herpesvirus 8	5
2.1.1	Das HHV-8 Genom	5
2.1.2	Epidemiologie von HHV-8	6
2.1.3	HHV-8 Vorkommen im Organismus	6
2.1.4	Primärinfektion und Folgeerkrankungen	7
2.2	Kaposi-Sarkom	7
2.2.1	Epidemiologie.....	7
2.2.2	Krankheitsbild.....	7
2.2.3	Unterschiedliche Formen des KS.....	8
2.2.4	KS und HHV-8.....	9
2.3	Primäre Erguss Lymphome	9
2.4	Multizentrische Castlemansche Erkrankung.....	10
2.5	CDC-Stadieneinteilung der HIV-Infektion und AIDS-Faldefinition von 1993	10
2.6	Onkogene Potenz von HHV-8	11
2.7	Bedeutung der Viruslast bei Herpesvirusinfektionen	11
2.8	Fragestellung der Arbeit	12
3	Material und Methoden	13
3.1	Geräte und Materialien	13
3.1.1	Geräte	13
3.1.2	Reagenzien	13
3.2	DNA Isolierung	14
3.3	TaqMan® Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	14
3.3.1	Methoden der Quantifizierung von Viren	14
3.3.2	Das Prinzip der PCR	15
3.3.3	Das Prinzip der Real-time TaqMan® PCR	16

3.3.4 Sondendesign	18
3.3.5 Primerdesign	18
3.3.6 Magnesium-Ionen	18
3.3.7 Das ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System (7700 SDS)	19
3.3.8 Nested PCR	19
3.3.9 Primer und Sonde	20
3.3.10 Mastermix	20
3.3.11 HHV-8 TaqMan® PCR für einen PCR-Ansatz mit 30 µl	21
3.3.12 Standardreihe	22
3.3.13 Magnesium Titration	24
3.3.14 Primer Titration	25
3.3.15 Housekeeping Gene	25
3.3.16 Photometrische Ermittlung der zellulären Kopienzahl.....	27
3.3.17 Lagerung der Substanzen	28
3.4 Statistik	28
4 Ergebnisse	29
4.1 Entwicklung einer Real-time PCR zur Bestimmung der HHV-8 Viruslast.....	29
4.1.1 Skalierte Farbtintensitäten einer TaqMan®-Versuchsreihe.....	29
4.1.2 Standardverdünnungsreihe	30
4.1.3 Negativkontrollen	32
4.1.4 Statistische Daten der HHV-8 Viruslastmessung	32
4.1.5 Bestimmung der eingesetzten Zellzahl mittels TaqMan® PCR für Housekeeping Gene	33
4.2 Untersuchtes Patienten Klientel	34
4.2.1 Korrelation zwischen der HHV-8 Viruslast und der Kaposi-Sarkom Inzidenz	35
4.3 Korrelation zwischen der HIV-1 Viruslast und der HHV-8 Viruslast.....	36
4.3.1 Korrelation zwischen der HIV-1 Viruslast und der HHV-8 Viruslast in Abhängigkeit von (HA)ART.....	37
4.4 Korrelation zwischen der CD4-Zellzahl und der HHV-8 Viruslast	38

4.5 (HA)ART Therapie.....	40
4.5.1 Korrelation zwischen der (HA)ART Therapie und der HHV-8 Viruslast	40
4.6 Korrelation zwischen der Gabe von Virostatika und der HHV-8 Viruslast.....	42
4.6.1 Aciclovir.....	42
4.6.2 Ganciclovir	43
4.6.3 Foscarnet	43
4.6.4 Zusammenfassung.....	43
4.7 Korrelation zwischen der Einnahme virostatischer/anti-retroviraler Therapeutika und der KS-Inzidenz	45
4.7.1 Aciclovir.....	45
4.7.2 Ganciclovir	46
4.7.3 Foscarnet	46
4.7.4 (HA)ART.....	47
5 Diskussion	48
5.1 Bestimmung der HHV-8 Viruslast mittels Real-time PCR.....	48
5.1.1 Quantifikation der Zellzahl mittels Housekeeping Gene.....	48
5.2 Einfluss der HHV-8 Viruslast auf die KS Inzidenz.....	49
5.3 Einfluss der HIV-1 Infektion auf die HHV-8 Infektion	50
5.4 Einfluss der (HA)ART Therapie auf die HHV-8 Infektion	50
5.4.1 (HA)ART Therapie	50
5.4.2 Einfluss der (HA)ART Therapie auf die KS Inzidenz.....	53
5.4.3 Einfluss der (HA)ART Therapie auf die HHV-8 Viruslast.....	55
5.5 Einfluss von Herpesvirus Therapeutika auf die HHV-8 Infektion	56
5.5.1 Einfluss von Herpesvirus Therapeutika auf die KS Inzidenz.....	56
5.5.2 Einfluss von Herpesvirus Therapeutika auf die HHV-8 Viruslast...	57
5.6 Weitere Therapiemöglichkeiten des KS.....	57
5.7 Ausblick	58
6 Zusammenfassung	60
7 Literaturverzeichnis.....	61
8 Anhang	74

8.1 Liste der verwendeten Abkürzungen	74
8.2 Ergebnistabelle	76
8.3 Abbildungsverzeichnis	86
8.4 Tabellenverzeichnis	87
9 Eigene Publikationen	88
10 Danksagung	89
11 Lebenslauf	90

2 Einleitung

2.1 Humanes Herpesvirus 8

2.1.1 Das HHV-8 Genom

HHV-8 (Humanes Herpesvirus 8) oder KSHV (Kaposi's sarcoma associated herpesvirus) gehört zur Gruppe der γ_2 -Herpesviren oder Rhadinoviren und ist mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) eng verwandt. Herpesviren bleiben nach der Primärinfektion lebenslang im Wirt. Das Genom von Herpesviren (100-250 kb) persistiert in latent infizierten Zellen in episomaler Form. Bei der Reaktivierung werden durch Rolling Circle Replikation lineare Formen des Genoms gebildet.

Das Genom von HHV-8 (Abb. 1) besitzt eine Größe von etwa 140 000 Basenpaaren und wird von mehreren repetitiven Sequenzen mit einer Länge von ungefähr 800 Basenpaaren flankiert (Russo et al., 1996). Bisher wurden 89 Gene oder ORF (open reading frames) im HHV-8 Genom identifiziert (Neipel et al., 1999).

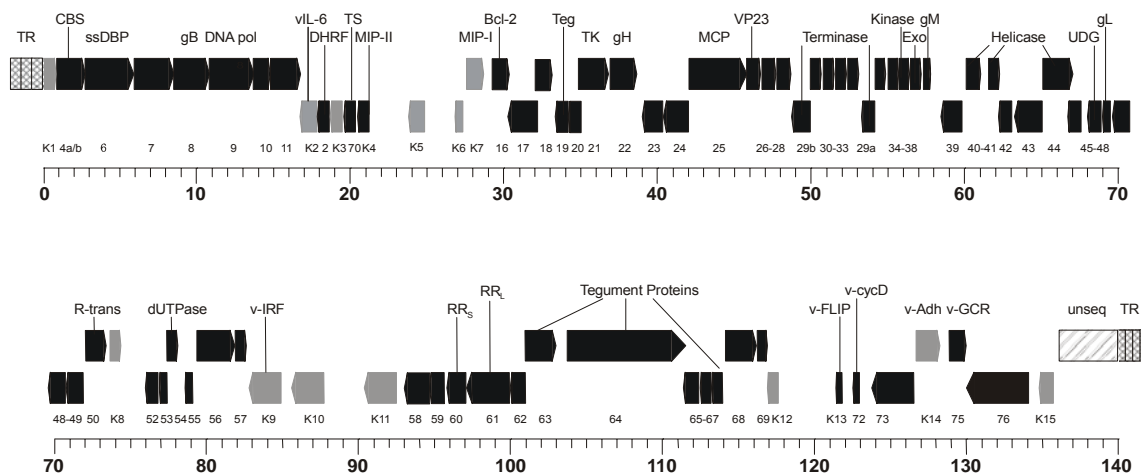


Abb. 1. HHV-8 Genom

2.1.2 Epidemiologie von HHV-8

Die Seroprävalenz von HHV-8 liegt in der Allgemeinbevölkerung in Nordeuropa und Nordamerika bei etwa 0-8% (Sarid et al., 1999). Bei HIV-positiven homosexuellen Männern in Nordeuropa und Nordamerika liegt die Seroprävalenz hingegen zwischen 30-37% (Jacobson et al., 2000).

Im mediterranen Raum und im Mittleren Osten ist die Seroprävalenz auch in der Allgemeinbevölkerung höher: Bis über 25% der Allgemeinbevölkerung sind beispielsweise auf Sardinien betroffen (Cattani et al., 2003). In einer sizilianischen Studie betrug die Seroprävalenz bei HIV-positiven bzw. HIV-negativen Homosexuellen sogar 62% bzw. 22% und bei weiblichen Prostituierten 42% (HIV-positiv) bzw. 30% (HIV-negativ) (Perna et al., 2000).

In Zentralafrika liegt die Seroprävalenz bei über 50%, wobei es keine signifikanten Unterschiede zwischen Männern und Frauen gibt (Mayama et al., 1998; Serraino et al., 2001). Diese Zahlen lassen vermuten, dass neben dem sexuellen Übertragungsweg noch eine andere Infektionsart besteht, zumal in manchen afrikanischen Gebieten die Seroprävalenz von HHV-8 bereits bei Kleinkindern erhöht ist (Serraino et al., 2001). In einer in Uganda durchgeführten Studie zeigte sich, dass die Seroprävalenz von HHV-8 bei Kleinkindern mit der Seroprävalenz von HBV korreliert, was zu der Annahme führt, dass HHV-8 perinatal übertragen werden kann (Mayama et al., 1998; Bourbouli et al., 1998).

2.1.3 HHV-8 Vorkommen im Organismus

In den transformierten Zellen, die auch als Spindelzellen bezeichnet werden, ist HHV-8 in latenter Form nachweisbar (Staskus et al., 1997). Nur vereinzelt (etwa 1%) liegt HHV-8 in Spindelzellen auch in der lytischen Form vor (Staskus et al., 1999).

Bei Patienten mit klinisch manifestem Kaposi-Sarkom (KS) konnte je nach Studie in bis zu 90% der Fälle HHV-8 auch in peripheren Blutzellen nachgewiesen werden (Decker et al., 1996; IARC Working Group, 1997), bei asymptomatischen HHV-8 Trägern hingegen nur in 10-20% (Whitby et al., 1998). Dabei handelt es sich meist um infizierte periphere B-Zellen und Monozyten, selten um T-Zellen (Harrington et al., 1996).

Zudem konnte es in Ejakulat und Speichel nachgewiesen werden (Perna et al., 2000; La Duca et al., 1998). In einer amerikanischen Studie stellte man fest, dass Speichel unter den Körperflüssigkeiten die höchsten Mengen an HHV-8 enthält, weshalb man neben dem sexuellen Transmissionsweg auch von einer direkten Übertragung durch Speichel ausgeht (Pauk et al., 2000; Martin, 2003; Taylor et al., 2004).

HHV-8 kann auch im Rahmen einer Nierentransplantation übertragen werden (Diociaiuti et al., 2000). In einer Schweizer Studie zeigte sich, dass 12% der Nierentransplantierten, die vor Transplantation seronegativ für HHV-8 waren, nach der Transplantation serokonvertiert sind (Regamey et al., 1998).

2.1.4 Primärinfektion und Folgeerkrankungen

Bei der Primärinfektion treten keine schweren Krankheitszeichen auf. Es werden lediglich Symptome wie Durchfall, Müdigkeit, Gelenkschmerzen, Hautausschlag sowie zervikale oder submandibuläre Lymphknotenschwellungen beobachtet (Oksenhendler et al., 1998; Qiong et al., 2001).

Neben dem KS ist HHV-8 mit zwei weiteren Erkrankungen assoziiert: dem Primären Erguss Lymphom (primary effusion lymphoma, PEL) und der multizentrischen Castlemanschen Erkrankung (multicentric Castleman's disease, MCD).

2.2 Kaposi-Sarkom

2.2.1 Epidemiologie

Das Kaposi-Sarkom wurde nach seinem Erstbeschreiber Dr. Moritz Kaposi benannt, der es im Jahre 1872 erstmalig beschrieb.

Jahrzehntelang galt das KS als eine seltene Erkrankung älterer Männer, die im Mittelmeerraum lebten oder jüdischer Herkunft waren. In den letzten 20 Jahren nahm jedoch die Inzidenz durch die Zunahme an HIV-Infektionen und AIDS rapide zu. Obwohl durch eine HIV-Infektion an sich schon das Risiko, ein KS zu bekommen, etwa 20.000 höher liegt als bei der Normalbevölkerung, ist die Inzidenz von KS unter den Subpopulationen der HIV-positiven sehr unterschiedlich (Beral, 1991). Die am häufigsten Betroffenen sind HIV-infizierte bi- und homosexuelle Männer. 15-25% von ihnen entwickeln im Laufe ihrer Erkrankung ein KS (Kedes et al., 1997). Bei einer vertikal erworbenen HIV-Infektion oder bei HIV-positiven Frauen hingegen ist das Risiko, ein KS zu entwickeln, mit 1-3% weitaus geringer (Beral, 1991).

2.2.2 Krankheitsbild

Die Erkrankung manifestiert sich typischerweise an der Haut oder an den Schleimhäuten der Nase, des Mundes oder des Anus. Die Läsionen erscheinen als Maculae oder Papulae, die entweder rosa, braun oder rot gefärbt sind. Manchmal kann es vor allem bei inguinalem oder periorbitalem Befall zu einer schmerzhaften Gewebsschwellung kommen.

Obwohl die Läsionen an der Haut entstellend sein können, sind sie in der Regel nicht lebensbedrohlich. Wenn die Läsionen hingegen innere Organe befallen, kann es durch das Auftreten von gastrointestinalen Blutungen oder pulmonal bedingter Dyspnoe zu schweren oder gar zu lebensbedrohlichen Krankheitsbildern kommen.

Histologisch sind Kaposi-Sarkome gekennzeichnet durch eine Proliferation von sogenannten Spindelzellen, die nach heutigem Kenntnisstand endothelialen Ursprungs sind, sowie durch begleitende inflammatorische Zellen (Boshoff et al., 2002; Wang et al., 2004). Mittels *in situ* Techniken wurde HHV-8 in den Spindelzellen lokalisiert (Boshoff et al., 1995; Li et al., 1996).

2.2.3 Unterschiedliche Formen des KS

2.2.3.1 Klassisches KS

Das klassische KS tritt bei Männern im Alter zwischen 50 und 70 Jahren auf, die entweder im Mittelmeerraum beheimatet oder jüdischer Herkunft sind. Die Patienten haben typischerweise eine oder mehrere Läsionen an den Beinen, vor allem im Bereich der Knöchel oder Fußsohlen. Die Läsionen nehmen nur langsam an Größe und Zahl zu. Durch die Läsionen kann es zum Abdrücken von Lymphgefäßen mit daraus resultierenden schmerzhaften Lymphödemem kommen. Nur sehr selten kommt es zum Befall innerer Organe.

2.2.3.2 Endemisches (afrikanisches) KS

Diese Form des KS betrifft Menschen, die in Zentralafrika leben. Diese Erkrankung ist dort relativ häufig. 9% aller malignen Erkrankungen unter ugandischen Männern sind Kaposi-Sarkome. Klinisch ist es dem klassischen KS sehr ähnlich, betrifft aber meist jüngere Menschen. Auch bei dieser Form erkranken häufiger Männer als Frauen (Ziegler et al., 2003). Eine Sonderform des endemischen KS befällt Kinder vor der Pubertät. Dieser Typ verläuft aggressiv und schließt insbesondere den Befall von Lymphknoten und inneren Organen mit ein. In den meisten Fällen führt es innerhalb von 3 Jahren zum Tode.

2.2.3.3 Erworbenes (Transplantations-assoziiertes) KS

Es tritt bei Patienten auf, deren Immunsystem aufgrund einer Organtransplantation medikamentös stark geschwächt ist. Die Inzidenz des KS ist bei transplantierten Patienten 150 bis 200 mal höher als in der Normalbevölkerung. Bis zu 1% aller Organtransplantierten entwickeln ein KS. Auch diese Form befällt meist nur die Haut, in seltenen Fällen kann es aber auch zum Befall innerer Organe kommen.

Das Transplantations-assoziierte KS tritt vor allem in jenen Gegenden auf, in denen auch das klassische KS gehäuft vorkommt. Im Unterschied zu anderen bei Immunsuppression auftretenden Malignomen ist es beim Transplantations-assoziierten KS nicht ungewöhnlich, dass es nach Aufheben der immunsuppressiven Therapie zur vollständigen Remission kommt.

2.2.3.4 Epidemisches KS

Das AIDS-assoziierte KS ist eine besonders aggressive und rasch progrediente Form. Im Gegensatz zum klassischen KS tritt das epidemische KS meist multizentrisch auf. Bei HIV-positiven Patienten, die sich mit HHV-8 infizieren, ist die Wahrscheinlichkeit, in den nächsten 5-10 Jahren ein KS zu entwickeln, um ein deutliches höher als bei HIV-negativen HHV-8-Trägern, was zu der Vermutung führt, dass HIV ein Kofaktor für die Entwicklung eines KS ist (Schulz, 2000). Mindestens jeder dritte Patient mit AIDS-assoziiertem KS erleidet einen lebensbedrohlichen Befall innerer Organe, meist des Respirations- oder des Gastrointestinaltraktes (Tulpule et al., 2000). Als Symptome treten Bauchschmerzen, Gewichtsverlust und blutige Durchfälle bei gastrointestinalem Befall sowie Dyspnoe, Husten und Hämoptoe bei respiratorischem Befall auf.

2.2.4 KS und HHV-8

Mittels *in situ* Techniken wurde HHV-8 in allen vier Formen des KS sowohl in den vaskulären Endothelzellen als auch in den Spindelzellen nachgewiesen (Chang et al., 1994; Dupin et al., 1995; Chang et al., 1996). Es gilt somit als notwendiger Faktor für die Entstehung eines KS. Wahrscheinlich sind jedoch noch einige andere Faktoren entscheidend für die Entstehung eines KS.

2.3 Primäre Erguss Lymphome

Primäre Erguss Lymphome (engl. primary effusion lymphoma, PEL) gehören zu den AIDS-assoziierten Non-Hodgkin-Lymphomen. Sie proliferieren als Aszites, Pleura- oder Perikard-erguss, bilden normalerweise keine Tumoren und haben den Phänotyp maligner Plasmazellen (Jenner et al., 2003). In den meisten Fällen treten sie bei HIV-positiven Patienten auf, die bereits an einem KS erkrankt sind. Die mittlere Überlebenszeit beträgt 5 Monate.

2.4 Multizentrische Castlemansche Erkrankung

Die Castlemansche Erkrankung ist ein seltenes Krankheitsbild, das sich in der lokalen Form durch Befall meist eines mediastinalen Lymphknotens oder in der multizentrischen Form durch Befall mehrerer Lymphknotenstationen, generalisierter Lymphadenopathie und systemischen Manifestationen mit B-Symptomatik äußert. Bei der multizentrischen Form (engl. multicentric Castleman disease, MCD) konnte bei 100% der HIV-assoziierten und bei 50% der nicht HIV-assoziierten Fälle HHV-8 nachgewiesen werden (Soulier et al., 1995). Eine besondere Rolle in der Pathogenese spielt wahrscheinlich IL-6, das systemisch in hohen Konzentrationen nachweisbar ist und mit dem klinischen Verlauf korreliert. HHV-8 kodiert ein virales Homolog zum zellulären IL-6, das gleichfalls systemisch nachweisbar ist (Haas, 1997).

2.5 CDC-Stadieneinteilung der HIV-Infektion und AIDS-Falldefinition von 1993

Die im Jahre 1993 von den Centers for Disease Control (CDC) veröffentlichte Stadieneinteilung der HIV-Infektion und AIDS-Falldefinition enthält sowohl klinische als auch labordiagnostische Kategorien.

Die drei klinischen Kategorien setzten sich aus der Kategorie A, die einer asymptomatischen oder akuten HIV-Infektion oder persistierenden generalisierten Lymphadenopathie (LAS) entspricht, der Kategorie B und der Kategorie C zusammen. Die Kategorie C enthält alle von der WHO seit 1987 als AIDS-definierend bezeichnete Erkrankungen wie z.B. Pneumocystis jiroveci Pneumonie, generalisierte Infektionen mit dem Zytomegalievirus (CMV) oder Malignome wie z.B. das Kaposi-Sarkom. Die Kategorie B beinhaltet alle Krankheitssymptome oder Erkrankungen, die nicht in die AIDS-definierende Kategorie C fallen, die aber dennoch der HIV-Infektion ursächlich zuzuordnen sind oder auf eine Störung der zellulären Immunabwehr hinweisen. Hierunter fallen somit unter anderem die orale Haarleukoplakie, periphere Neuropathien oder oropharyngeale Candida-Infektionen.

Als labordiagnostisches Einteilungskriterium gilt die CD4-Lymphozyten Zellzahl (pro μl). Hierbei wurde eine Einteilung in drei Gruppen vorgenommen: Gruppe 1 entspricht einer CD4-Zellzahl $\geq 500/\mu\text{l}$, Gruppe 2 einer CD4-Zellzahl zwischen 200 und $499/\mu\text{l}$, und Gruppe 3 einer CD4-Zellzahl $< 200/\mu\text{l}$.

2.6 Onkogene Potenz von HHV-8

Aufgrund der engen Verwandtschaft mit EBV (einem onkogenen Virus) und die Assoziation mit mindestens zwei menschlichen Tumoren hat man schon bei seiner Entdeckung vermutet, dass HHV-8 transformierende Potenz besitzt. Bei der Sequenzierung wurden mehrere Gene mit zellulären Homologen entdeckt, die eine potentielle Rolle bei der malignen Transformation besitzen. Diese viralen Gene haben strukturelle Homologien zu zellulären Wachstumsfaktoren (vIL-6), anti-apoptischen Proteinen (vBcl-2), Apoptose-regulierenden Proteinen (vFLIP) und Regulatoren des Zellzyklus (v-Cyclin) (Direkze et al., 2004).

2.7 Bedeutung der Viruslast bei Herpesvirusinfektionen

Die acht humanpathogenen Herpesviren besitzen die Gemeinsamkeit, meist ein Leben lang in der Wirtszelle zu persistieren und durch bestimmte Auslöser reaktiviert zu werden. Besonders bei Immundefizienten wie z.B. HIV-Infizierten im AIDS-Stadium oder hämatoonkologischen Patienten kann solch eine Reaktivierung zu schwerwiegenden Folgen bis hin zum Tode führen. Zu schweren Komplikationen können vor allem Infektionen mit CMV und EBV führen. Daher ist die frühzeitige Diagnosestellung entscheidend. Beispielsweise ist bei der schwersten Form einer CMV-Infektion, der interstitiellen Pneumonie z.B. nach Knochenmarktransplantation, eine Therapie bei manifester Erkrankung kaum erfolgsversprechend. In den letzten Jahren sind Einsichten in die Pathogenese dieser Virusinfektion gewonnen worden, die zur Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Konzepte führten, bei denen die engmaschige Überwachung und Frühintervention durch Gabe des Nucleosidanalogs Ganciclovir im Mittelpunkt stehen. Die Methode der quantitativen Viruslastbestimmung hat sich hierbei als sehr hilfreich gezeigt: Mit Hilfe der Viruslast lässt sich sowohl frühzeitig eine Reaktivierung als auch der Schweregrad der Erkrankung beurteilen (Chen et al., 2004).

Die bei Knochenmarktransplantationen von Kindern gefürchtete Post-Transplantations-Lymphoproliferation (post-transplant lymphoproliferative disease, PTLD) ist oft mit dem raschen Anstieg der Viruslast des EBV assoziiert. Durch Messung der Viruslast ist eine Prävention bzw. rasche Intervention möglich (Smets et al., 2002).

Beim Nasopharynx-Karzinom, einer mit EBV assoziierten Neoplasie, kann die Viruslastbestimmung von EBV als Monitoring und als Prognosefaktor angewandt werden (Lin et al., 2004).

2.8 Fragestellung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine quantitative PCR mit Hilfe der TaqMan[®]-Technik für HHV-8 entwickelt werden. HHV-8, das in der Pathogenese des KS, MCD und PEL eine entscheidende Rolle spielt, sollte in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) HIV-infizierter Patienten quantitativ bestimmt werden. Die HHV-8 Viruslast sollte anschließend mit der HIV Viruslast, der CD4-Zellzahl und der anti-retroviralen und virostatischen Therapie korreliert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte und Materialien

3.1.1 Geräte

ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System (7700 SDS) (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)

Power Macintosh 4400

Software „Primer Express“ (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)

MicroAmp® Optical Caps (PE Applied Biosystems, Weiterstadt (N8010-0935))

MicroAmp® Optical 96-well Plate (PE Applied Biosystems, Weiterstadt (N8010-0560))

Photometer Gene Quant II (Pharmacia/LKB, Freiburg)

Vortexer (IKA-Labortechnik, Staufen i.Br.)

3.1.2 Reagenzien

2x Taqman Universal PCR-Mastermix (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)

Proben: DNA-Extrakte aus humanem Blut (zur Verfügung gestellt von Dr. Oktavian Schatz, Infektionslabor, Medizinische Poliklinik, LMU München)

Primer: Primer 1 (HHV8VP23for): 5' GCT AGC AGT GCT ACC CCC ATT 3'

Primer 2 (HHV8VP23rev): 5' GGT CAA ATC CGT TGG ATT CG 3'

(GIBCO BRL - life Technologies, Karlsruhe)

Sonde (HHV8VP23S): 5' AGC CGA AAG GAT TCC ACC ATT GTG C 3' (PE Applied Biosystems, Wertheim)

Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents Control Kits for Human Large Ribosomal Protein (Perkin Elmer, Wertheim)

QIAamp Blood Mini Kit (250 QIAamp Spinsäulen, QIAGEN Proteinase K, Reagenzien, Puffer und Collection Tubes (2 ml)) (Quiagen, Hilden)

Magnesiumchlorid 25 mM (Merck, Darmstadt)

3.2 DNA Isolierung

Für die Extraktion der DNA wurden 200 µl EDTA-Blut HIV-positiver Patienten (freundlicherweise von Prof. Johannes Bogner und Prof. Detlev Goebel, Infektionslabor der Medizinischen Poliklinik, LMU München zur Verfügung gestellt) eingesetzt. Sie wurden nach dem Protokoll für den QIAamp Blood Mini Kit (Quiagen, Hilden) behandelt.

20 µl QUIAGEN Protease-Stammlösung wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 200 µl EDTA-Blut vermischt, 200 µl Buffer AL zur Probe hinzugegeben und anschließend für 10 min bei 56°C inkubiert. Danach wurden 200 µl 2-Propanol hinzugegeben und das Gemisch auf die QIAamp Spinsäule pipettiert. Anschließend wurde für 1 min bei 6000 x g zentrifugiert und das Gemisch je einmal mit Waschpuffer AW1 und AW2 gewaschen, nach jedem Waschschrift zentrifugiert und daraufhin 200 µl AE Buffer zur Elution der DNA auf die Säule hinzugefügt.

Die DNA-Proben wurden bei -20°C gelagert.

3.3 TaqMan® Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.3.1 Methoden der Quantifizierung von Viren

In Abhängigkeit von der zu untersuchenden Probe (Gewebeprobe, Körperflüssigkeiten) gibt es verschiedene Methoden, die Viruslast zu bestimmen (Boeckh et al., 1998).

Mithilfe viraler Kulturtechniken werden Fibroblasten mit der zu untersuchenden Probe infiziert, wobei die infizierten Fibroblasten sogenannte Plaques bilden. Je nach Ausgangskonzentration der Viruslast bilden sich bestimmte Mengen von Plaques, die mikroskopisch ausgezählt werden.

Durch Antigendetektionsassays können in Zellkulturen mithilfe monoklonaler Antikörper, die gegen bestimmte Antigene des Virus gerichtet sind, infizierte Zellen markiert und quantifiziert werden.

Die Real-time Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction = PCR) eröffnet ganz neue Möglichkeiten in der Quantifizierung von Nukleinsäuren. Bisher beschränkte man sich bei der quantitativen PCR-Analyse entweder auf die bloße Abschätzung der Amplifikat-Mengen aus der Gelelektrophorese oder es wurden mehrere Ansätze in Gegenwart einer konkurrierenden Kompetitor-Amplifikation durchgeführt, um das Target gegen die bekannte Kompetitor-menge auszutitrieren. Die mittels Fluoreszenzmessung mögliche kontinuierliche Bestimmung der Amplifikatmenge erlaubt eine viel einfachere Bestimmung der Templatmenge.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, um reaktionsabhängig fluoreszente Signale zu erzeugen. Am einfachsten ist die Verwendung eines Farbstoffes, der an doppelsträngige DNA bindet und dann fluoresziert (Ethidiumbromid, SYBR Green). Daneben gibt es die Methode der benachbarten Hybridisierung, bei der zwei Oligonukleotide nebeneinander oder gegenüber hybridisiert werden (z.B. LightCycler®). Die Messung erfolgt hier über die Fluoreszenz des Akzeptorfarbstoffes. Eine weitere Form der Hybridisierungssonden sind die Molecular Beacons, die an ihren Enden selbstkomplementäre Enden und ein Fluorophor/Quencher-Paar tragen, so dass sie in Abwesenheit einer komplementären Sequenz in einer gefalteten Stem-Loop Struktur vorliegen und erst mit einem entsprechenden Target ein Fluoreszenzsignal liefern.

Eine weitere Form der sogenannten "Real-time PCR" ist die TaqMan® PCR, die in unserer Arbeit angewandt wurde.

3.3.2 Das Prinzip der PCR

Die Mitte der Achtziger Jahre von Mullis (Mullis et al., 1987) entwickelte Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine sehr schnelle und sensitive Methode zur *in vitro* Amplifizierung spezifischer DNA-Abschnitte und ermöglicht somit die Detektion kleinster DNA-Mengen.

Das Prinzip der PCR basiert auf der enzymatischen Vermehrung eines bestimmten DNA-Abschnittes, der zwischen zwei Startersequenzen, den sogenannten Primern, liegt. Die Basenabfolge der beiden Primer muss komplementär zur amplifizierenden DNA-Sequenz sein. Binden die Primer an die komplementären DNA-Abschnitte, katalysiert die Taq-DNA-Polymerase die *in vitro* DNA-Synthese (Abb.2).

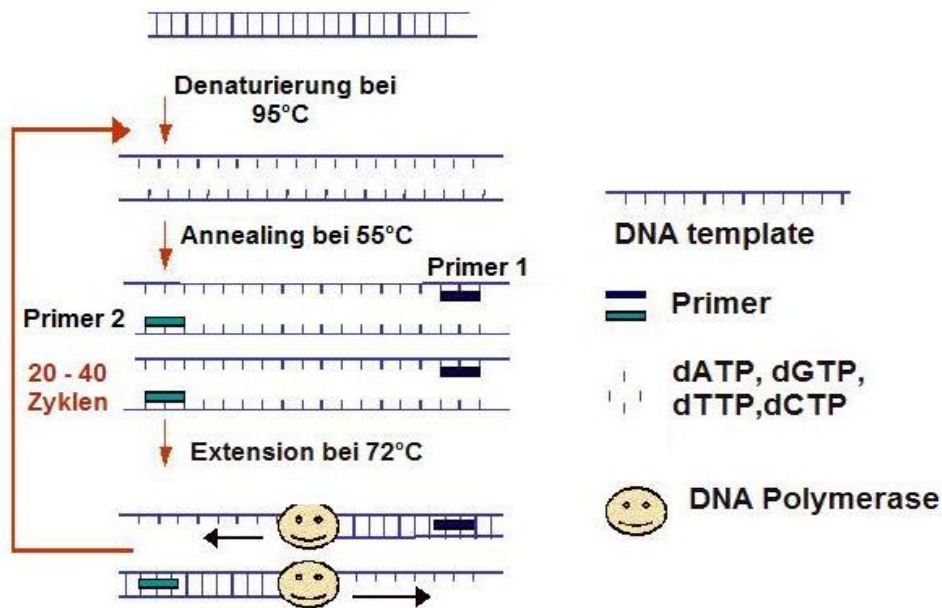


Abb. 2. PCR Prinzip: Die DNA-Synthese erfolgt in drei Schritten: Jeder Zyklus besteht aus 1) einem Denaturierungsschritt, bei dem die DNA durch Erhitzen auf 95°C denaturiert wird und bei dem durch das Halten dieser Temperatur für kurze Zeit (etwa 5-30 sec) Einzelstränge gebildet werden, 2) einem Hybridisierungsschritt, in dem die beiden Primer bei einer für den Primer bzw. das Primerpaar optimalen Temperatur (etwa 55–65°C) an den jeweils komplementären Strang binden (Annealing), und 3) einem Syntheseschritt, währenddem der zwischen den Primern liegende DNA-Abschnitt mithilfe der DNA-Polymerase und der im Reaktionsmix vorhandenen Desoxyribonukleotide selektiv synthetisiert wird.

3.3.3 Das Prinzip der Real-time TaqMan® PCR

In vielen Fällen ist eine Quantifizierung der Ausgangstemplatemenge nötig, z.B. in unserem Falle bei der Virusquantifizierung. Daher war man bemüht, einen sogenannten homogenen Assay zu entwickeln, bei dem Amplifikation und der Nachweis des PCR-Produkts simultan in einem Reaktionsgefäß ermöglicht werden. Dies gelang erstmals 1991 mit dem von Holland und Mitarbeitern beschriebenen 5'-Nuklease PCR-Assay unter Ausnützung der 5'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase zur Detektion der sequenzspezifischen Amplifikation (Holland et al., 1991).

Bei dieser sogenannten Real-time PCR wird während der Amplifikation ein Fluoreszenzsignal erzeugt, das proportional zur Zunahme des PCR-Produktes ist. Die dabei verwendete Sonde (TaqMan[®] Sonde = "Probe") ist ein Oligonukleotid mit einer Sequenz komplementär zum amplifizierenden Fragment. Die Sonde ist an ihren Enden mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen, einem Reporter und einem Quencher, konjugiert. Der fluoreszierende Reporterfarbstoff (ein Fluorescein-Derivat) ist kovalent an das 5'-Ende der Sonde geknüpft. Den unterschiedlichen Reporterfarbstoffen steht jeweils der Quencher-Farbstoff (ein Rhodamin-Derivat) gegenüber. Der Quencher wird über ein Linker-Arm-modifiziertes-Nukleotid (LAN) an das 3'-Ende der Sonde gebunden.

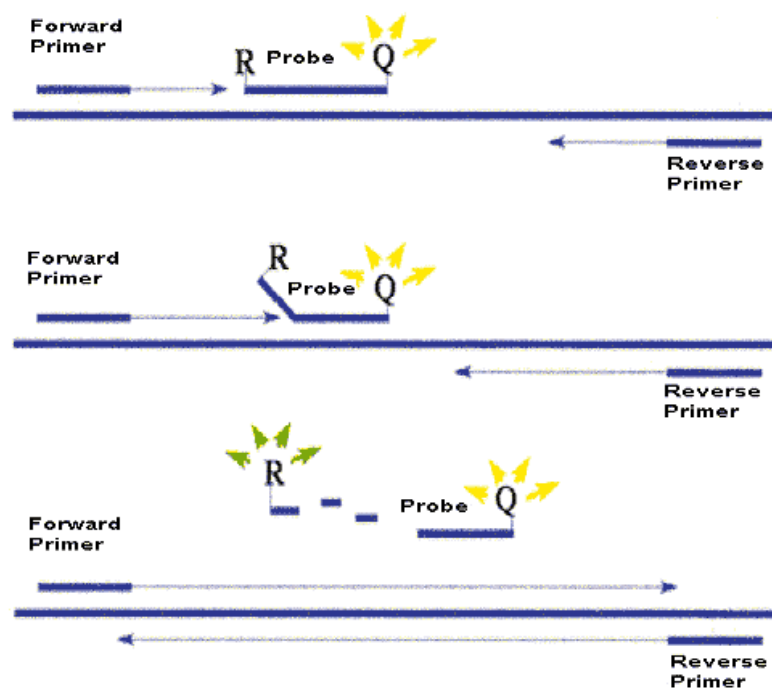


Abb. 3. Das Prinzip der TaqMan[®] PCR

Wird die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge von 488 nm zur Fluoreszenz angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher unterdrückt. Während der PCR hybridisiert die Sonde mit den Primern zunächst an den Matrizen-Strang. In der Extensionsphase trifft die Taq-Polymerase nun auf die Sonde und beginnt sie zu verdrängen. Es entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur, wodurch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq-DNA-Polymerase aktiviert und die Sonde geschnitten wird. Reporter und Quencher werden räumlich getrennt und man erhält ein Lichtsignal vom Reporter (Abb.3). Freie, nicht hybridisierte Sonde wird hingegen nicht hydrolysiert. Da in jedem Zyklus neue Reporter-Moleküle freigesetzt werden, steigt die Fluoreszenz proportional zur Anzahl synthetisierter PCR-Produkte an.

3.3.4 Sondendesign

Um eine möglichst optimale TaqMan[®] Sonde auszuwählen, müssen bestimmte Faktoren berücksichtigt werden, die mit Hilfe einer von PE Applied Biosystems angebotenen Software „Primer Express“ erleichtert werden können.

Damit es zu einer Hydrolyse der Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq-DNA-Polymerase kommen kann, muss die Sonde zuvor stabil an die Zielsequenz hybridisiert werden. Um dies zu erreichen, sollte z.B. der GC-Gehalt der Sonde etwa 50% betragen (20-80% repräsentieren die untere bzw. obere Grenze), mehr als drei Nukleotide eines Typs (insbesondere keine Poly-G-Bereiche) in Folge vermieden werden und zudem auch keine Komplementarität zu den beiden PCR-Primern bestehen.

Um eine ausreichende Spezifität zu erzielen, sollte die optimale Länge der Sonde ca. 20-30 Nukleotide betragen. Die Platzierung der Sonde innerhalb des Amplikons kann überall zwischen den beiden Primer-Sequenzen erfolgen. Das 5'-Ende der Sonde sollte idealerweise relativ nahe beim 3'-Ende des PCR-Primers liegen, wobei eine Überlappung der beiden Sequenzen nicht erlaubt ist.

Schließlich wurde mit Hilfe einiger Datenbanken sichergestellt, dass die Sequenzen der Sonde und auch der Primer keine signifikanten Homologien mit anderen bekannten Nukleotidsequenzen aufweisen.

3.3.5 Primerdesign

Besonders gute Ergebnisse erzielt man bei einer Amplicon-Länge von ca. 75-150 bp, die Länge der Primer sollte zwischen 18 und 30 Basen betragen. Des Weiteren sollte das Verhältnis von G/C zu A/T im Primer kleiner 50% sein, aufgrund möglicher unspezifischer Bindungen sollten Poly-T-Bereiche vermieden werden.

3.3.6 Magnesium-Ionen

Bei der TaqMan[®] PCR kommt dem Magnesiumchlorid neben seiner Funktion als essentiellm Kofaktor der AmpliTaq-DNA-Polymerase eine weitere Bedeutung für die Höhe eines positiven Signals zu, da es einen großen Einfluss auf die effiziente Anbindung der Sonden während der Annealing/Extensions-Reaktion besitzt.

3.3.7 Das ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System (7700 SDS)

Das 7700 SDS besitzt einen eingebauten Thermocycler. Über jeder Thermocycler-Position befindet sich eine Linse, die den Lichtstrahl in das jeweilige Reaktionsgefäß weiterleitet.

Die Fluoreszenzanregung erfolgt mittels eines Argonlasers (488 nm), dessen Strahl über einen dichroiden Spiegel zunächst auf einen Multiplexer gelenkt wird, der wiederum über 96 Lichtleiter mit dem optischen Heizdeckel des Thermocyclers verbunden ist. Jeder der Lichtleiter endet über einer der 96 Linsen. Von jeweils einer der Linsen fokussiert, dringt der Laserstrahl in das geschlossene Reaktionsgefäß ein und regt dort die Fluoreszenzemission an, welche den Thermocycler wieder über jeweils den selben optischen Leiter verlässt. Da die Fluoreszenz eine andere Wellenlänge besitzt als der Laserstrahl, wird sie vom dichroiden Spiegel reflektiert, über eine Linse erneut fokussiert, auf einen Spektrographen geleitet und mittels einer CCD-Kamera (charge coupled device = ladungsgekoppelte Halbleiterelemente) in ein digitales Signal umgewandelt.

Für die Analyse im geschlossenen Reaktionsgefäß werden spezielle, optische Reaktionsgefäße benötigt, die keine störende Autofluoreszenz besitzen (z.B. MicroAmp® Optical 96-Well Plate, PE Applied Biosystems). Die Steuerung des Systems erfolgt vollständig über einen Power Macintosh 4400.

Das Signal einer TaqMan® PCR repräsentiert die Veränderung in der Fluoreszenz-Emission des Reporter-Farbstoffs aufgrund der Hydrolyse der sequenzspezifischen Sonde.

3.3.8 Nested PCR

Da die AmpliTaq-DNA-Polymerase Gold bereits bei Temperaturen von $>55^{\circ}\text{C}$ eine signifikante Aktivität besitzt, bietet es sich an, Annealing und Extension zu einem Schritt zusammenzufassen und somit auf eine separate Extension bei 72°C zu verzichten. Neben einer höheren Spezifität der PCR bei der Wahl von höheren Annealing-Temperaturen hat die Nested PCR noch einen weiteren Vorteil: Da die Extension bei einer Temperatur $<72^{\circ}\text{C}$ durchgeführt wird, hat die AmpliTaq-DNA-Polymerase einen positiven Einfluss auf die Bindung der Sonde, so dass ihre Hydrolyse effizienter verlaufen kann.

3.3.9 Primer und Sonde

Die Auswahl der Primer und Sonde erfordert einige grundlegende Voraussetzungen, die bereits ausführlich erläutert wurden (siehe 2.3.4 und 2.3.5). Unter Berücksichtigung dieser Punkte erfolgte mittels der Software „Primer Express“ (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) die Auswahl folgender Oligonukleotide:

Name	Sequenz (5´-3´)	Hersteller
HHV8VP23for (Primer 1)	GCT AGC AGT GCT ACC CCC ATT	GIBCO BRL-life Technologies, Karlsruhe
HHV8VP23rev (Primer 2)	GGT CAA ATC CGT TGG ATT CG	GIBCO BRL-life Technologies, Karlsruhe
HHV8VP23S (Sonde)	VIC -AGC CGA AAG GAT TCC ACC ATT GTG C- Tamra	PE Applied Bio- systems, Weiterstadt

Tabelle 1: Sequenzen der verwendeten Primer und Sonde

Die Sonde HHV8VP23S ist an ihrem 5´-Ende mit dem Reporter VIC, an ihrem 3´-Ende mit dem Quencher Tamra konjugiert.

3.3.10 Mastermix

Für den TaqMan[®] PCR-Ansatz wurde der vorgefertigte „2x TaqMan[®] Universal PCR-Mastermix“ von Applied Biosystems (Weiterstadt) verwendet, zu dem noch die DNA, Primer und Sonde hinzugegeben wurden und mit destilliertem H₂O auf 30 µl aufgefüllt wurde.

Der Mastermix beinhaltet die AmpliTaq-Gold-DNA-Polymerase, AmpErase UNG, dNTPs mit dUTP, eine passive Referenz und einen angepassten Puffer mit Magnesiumchlorid. Die AmpliTaq-Gold-DNA-Polymerase ist eine modifizierte Form der rekombinanten AmpliTaq-DNA-Polymerase, die bei Raumtemperatur keine Aktivität zeigt und zu ihrer Aktivierung anfänglich für 10 Min. auf 95°C erhitzt werden muss und so die Bildung von Primer-Dimeren verhindert. Zum Schutz vor Carryover-Kontamination bei der Pipettierung der Ansätze ist dem Mastermix AmpErase UNG (Uracil-N-Glykosylase) hinzugefügt worden. Bei Verwendung von dUTPs in den PCR-Reaktionen wird durch die Glykosylase eingebautes UTP von Carryover-Kontaminationen in einem

anfänglichen 50°C Schritt gespalten. Die anschließenden 10 Min. bei 95°C inaktivieren das Enzym, um in der folgenden PCR-Amplifikation nicht zu stören.

Als passive Referenz wurde der Farbstoff Rox hinzugegeben, der keinen Einfluss auf die PCR hat und die Fluoreszenzfluktuationen in der Normalisierung der Fluoreszenzsignale ausgleicht. Dieser normalisierende Effekt geht folgendermaßen in die Berechnungen ein:

R_n-Wert: normalisiertes Reportersignal; Quotient der Emissions-Intensität des Reporterfarbstoffs dividiert durch die Emissions-Intensität des passiven Referenzfarbstoffs.

ΔR_n-Wert: Weitere Schwankungen, die nicht auf dem PCR-abhängigen Nukleaseverdau basieren, werden ausgeglichen, indem das binnen der ersten PCR-Zyklus erstellte Hintergrundsignal vom jeweiligen R_n-Wert abgezogen wird.

C_T-Wert: Der sogenannte Threshold Cycle entspricht der Zyklenzahl, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über die Grundlinie erfasst wird.

3.3.11 HHV-8 TaqMan[®] PCR für einen PCR-Ansatz mit 30 µl

Reagenzien	Volumen [µl]	Ausgangskonzentration
Steriles H ₂ O	8,2	
2x TaqMan [®] Universal PCR-Mastermix	15	2fach konzentriert
HHV8VP23for (Primer 1)	0,6	10 mM
HHV8VP23rev (Primer 2)	0,6	10 mM
HHV8VP23S (Sonde)	0,6	10 mM
Volumen Mastermix	25 µl	

Tabelle 2: Mastermix für TaqMan[®] PCR

Der gesamte Mastermix wurde gevortext und davon je 25 µl in Einzelansätze (MicroAmp[®] Optical 96-Well Plate) aufgeteilt.

Reagenzien	Volumen [μ l]	Bemerkung
Steriles H ₂ O oder DNA Probe	5 5	Negativkontrolle Konzentration jeweils photometrisch bestimmt
Gesamtvolumen	30	

Tabelle 3: Zugabe der Proben zum PCR-Mastermix

Das PCR Programm bestand aus folgendem 2-Schritt PCR-Mechanismus:

Schritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Dauer	Bemerkung
UNG Verdau	50	2 min	
AmpliTaQ Gold Aktivierung	95	10 min	
Denaturierung	95	15 s	45 Zyklen
Annealing und Extension	60	1 min	

Tabelle 4: Thermocycler-Programm für HHV-8 TaqMan[®] PCR

3.3.12 Standardreihe

3.3.12.1 Plasmid

Für die quantitative Bestimmung der HHV-8 Konzentration mittels TaqMan[®] PCR ist eine Kalibrierung dieses Systems mit DNA-Lösungen bekannter Kopienzahl eine unabdingbare Voraussetzung. Als Referenz-/Standardmaterial für diese Bestimmung können Plasmide dienen, die ein spezifisches HHV-8 DNA-Fragment (in unserem Fall ORF 26) enthalten. Dieses Fragment kann dann durch die jeweiligen Primer (in unserem Fall HHV8VP23for und HHV8VP23rev) und Sonden (HHV8VP23S) nachgewiesen werden.

Plasmide können im Gegensatz zu genomischer DNA einfach in reiner Form dargestellt und danach mittels UV-Spektroskopie quantifiziert werden. Das Referenzplasmid für den quantitativen Nachweis der HHV-8 DNA heißt: Vektor pR SET a mit eingebautem ORF 26.

3.3.12.2 Minor Kapsidprotein ORF 26

Das Gen ORF 26 (open reading frame 26) kodiert für das Minor Kapsidprotein, das nur in HHV-8 infizierten Zellen in der lytischen Phase exprimiert wird (O'Neill et al., 1997).

3.3.12.3 Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgte mit Hilfe einer sogenannten Standardreihe. Damit eine Standardreihe effizient erstellt werden kann, sind mindestens fünf Verdünnungsstufen erforderlich, z.B. 100, 1000, 10^4 , 10^5 , 10^6 Kopien. Anhand der Verdünnungsreihe kann eine Standardkurve mittels gemessener C_T -Werte erstellt und die Ausgangsmenge der unbekannt Probe über die Standardkurve bestimmt werden.

3.3.12.4 Spektralphotometrische Bestimmung der Plasmidkonzentration

Hierzu wurde die DNA-Menge der hochreinen Plasmidisolierung (Vektor pR SET a mit eingebautem ORF 26, freundlicherweise von PD Dr. Dr. J. Haas bereitgestellt) bestimmt.

DNA-Moleküle können durch UV-Licht der Wellenlänge 260 nm angeregt werden. Diese Eigenschaft kann zur spektralphotometrischen Bestimmung der Nukleinsäuremenge genutzt werden. Eine relative Absorption oder Optische Dichte (OD) von 1 bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 260 nm entspricht einer Konzentration an doppelsträngiger DNA von 50 $\mu\text{g/ml}$.

Zur Bestimmung der Plasmidkonzentration wurden insgesamt 4 μl Plasmid-DNA mit 796 μl H_2O gemischt und insgesamt achtmal 100 μl dieser Lösung in eine Quarzglasküvette gefüllt. Die Absorption bei 260 nm wurde an einem Spektralphotometer (Photometer Gene Quant II, Pharmacia /LKB, Freiburg) gegen H_2O gemessen. Der Mittelwert dieser 8 gemessenen Konzentrationen lag bei 1,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ und wurde als Ausgangswert eingesetzt.

3.3.12.5 Berechnung der Plasmidkopienzahl

Ausgehend von der photometrisch bestimmten Menge der Plasmid-DNA wurde deren Kopienzahl wie folgt berechnet:

Durchschnittliches Molekulargewicht von Desoxy-Nukleosidmonophosphaten (dNMP):

dAMP: 313,2 g/mol

dCMP: 289,2 g/mol

dGMP: 329,2 g/mol

dTMP: 304,2 g/mol

dNMP: 308,95 g/mol

Berechnung des Vektormolekulargewichtes:

Basenpaare des Vektors pR SET a:	2940
Basenpaare des Inserts ORF 26:	917
Basenpaare des Vektors mit Insert:	3857
Basenpaare des doppelsträngigen Vektors mit Insert:	7714
Molekulargewicht des Vektors mit Insert:	$7714 \times 308,95 \text{ g/mol} =$ $2383240,3 \text{ g/mol}$

Stoffmenge [mol] der Plasmidlösung:

Spektralphotometrische Bestimmung der DNA-Menge:	1,8 µg/µl
1 mol doppelsträngiger Vektor mit Insert:	2 383 240,3 g
1 g doppelsträngiger Vektor mit Insert:	$4,19597 \times 10^{-7} \text{ mol}$
1,8 µg doppelsträngiger Vektor mit Insert:	$7,55274 \times 10^{-13} \text{ mol}$

Umrechnung Stoffmenge zu Teilchenzahl (= Kopienzahl):

1 mol = $6,023 \times 10^{23}$ Teilchen (Avogadro-Konstante)

$7,55274 \times 10^{-13} \text{ mol} = 4,54902 \times 10^{11}$ Kopien

Die Stammlösung des Plasmids enthält also 1,8 µg DNA/µl, das entspricht $4,55 \times 10^{11}$ Kopien/µl.

Zur Kalibrierung wurde aus dieser Stammlösung eine Verdünnungs-/Standardreihe mit 5×10^6 bis 5×10^2 Kopien pro Ansatz verwendet. Um Fehler durch mögliche DNA-Abbauprozesse bei wiederholtem Einfrieren und Auftauen zu vermeiden, wurden alle hergestellten Verdünnungen aliquotiert und maximal zweimal aufgetaut.

3.3.13 Magnesium Titration

Bei der TaqMan[®] PCR kommt dem Magnesiumchlorid (MgCl_2) neben seiner Funktion als essentiellm Kofaktor der AmpliTaq-DNA-Polymerase Enzymfunktion eine weitere Bedeutung für die Höhe eines positiven Signals zu, da es einen großen Einfluss auf die effiziente Anbindung der Sonden während der Annealing-/Extensions-Reaktion besitzt. Dieser Einfluss ist umso stärker, je weiter Reporter und Quencher voneinander entfernt sind. Wahrscheinlich nehmen Sonden in einer Mg(II)-armen Reaktionsumgebung aufgrund elektrostatischer Abstoßung der negativen Ladungen der Phosphatreste des Moleküls eine gestreckte Form an. Dadurch würde der negative Einfluss des

Abstands zwischen den Fluophoren auf den Quenching-Effekt zunehmen. Durch Bindung von Mg(II) können diese Abstoßungskräfte neutralisiert werden, die Sonde gewinnt wieder an Flexibilität und kann sich wieder falten. Dadurch gelangen 5'- und 3'-Ende der Sonde wieder relativ in Nähe zueinander und ein Quenching ist wieder möglich. Daher wurde eine Titration durchgeführt mit Magnesiumkonzentrationen zwischen 5 mM und 9 mM. Als Ausgangslösung wurde eine 25 mM Magnesiumchloridlösung (Merck, Darmstadt) verwendet.

3.3.14 Primer Titration

Zur Optimierung der Reaktionsergebnisse wurden zudem zwei unterschiedliche Primerkonzentrationen (je 200 mM und 600 mM) verwendet.

3.3.15 Housekeeping Gene

3.3.15.1 Prinzip der Housekeeping Gene

Hierbei handelt es sich um Gene, die in allen Zellen exprimiert werden und die für Proteine kodieren, die für die Erhaltung und Durchführung essentieller zellulärer Funktionen notwendig sind. Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH), β -Aktin, β_2 -Microglobulin (β_2M) und Cyclophilin gehören zu den am häufigsten verwendeten endogenen Kontrollgenen (Thellin et al., 1999). Geht man davon aus, dass diese Housekeeping Gene unabhängig vom Stimulationszustand in allen Zellen in annähernd gleicher Menge vorkommen, kann man mittels einer im Handel erhältlichen Standardreihe mit bekannter Genmenge (z.B. Pre-Developed TaqMan[®] Assay Reagents Control Kits) mittels Real-time PCR die unbekannte Genmenge einer DNA-Probe quantifizieren.

3.3.15.2 Pre-Developed TaqMan[®] Assay Reagents Control Kits

Hierbei handelt es sich um ein von Applied Biosystems entwickelten Fertig-Kit, der das „human acidic ribosomal protein“ (Art. Nummer P/N 4310879 E) detektiert. In ihm enthalten sind passende Primer und eine mit VIC markierte Sonde. Die passende Kontroll-DNA wurde freundlicherweise von Dr. Hans Nitschko (Max- von-Pettenkofer Institut, LMU München) zur Verfügung gestellt. Dabei wurde eine Standardverdünnungsreihe in 10er Schritten (analog der Plasmid-Verdünnungsreihe) erstellt mit DNA-Kopienzahlen zwischen $2,2 \times 10^4$ Geq/5 μ l und $2,2 \times 10^1$ Geq/5 μ l.

Als unbekannte Proben wurden insgesamt acht verschiedene Patientenproben in jeweils doppelter Ausführung mituntersucht.

Mastermix für einen PCR Ansatz mit 30 µl:

Reagenzien	Volumen [µl]	Ausgangskonzentration
Steriles H ₂ O	7,5	
2x TaqMan [®] Universal PCR-Mastermix	15	2fach konzentriert
20x "human acidic ribosomal protein" Kit	2,5	20 mM

Tabelle 5: Mastermix für TaqMan[®] PCR mit „human acidic ribosomal protein“ Kit

Der gesamte Mastermix wurde gevortext und je 25 µl in Einzelansätze (MicroAmp[®] Optical 96-Well Plate) aufgeteilt.

Reagenzien	Volumen [µl]	Bemerkung
Steriles H ₂ O oder	5	Negativkontrolle
DNA Probe	5	Konzentration jeweils photometrisch bestimmt
Gesamtvolumen	30	

Tabelle 6: Zugabe der DNA-Proben zum PCR Mastermix

Das PCR Programm bestand aus folgendem 2-Schritt PCR Mechanismus:

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer	Bemerkung
UNG Verdau	50	2 min	
AmpliAq Gold Aktivierung	95	10 min	
Denaturierung	95	15 s	45 Zyklen
Annealing und Extension	60	1 min	

Tabelle 7: Thermocycler-Programm für TaqMan[®] PCR mit „human acidic ribosomal protein“ Kit

3.3.16 Photometrische Ermittlung der zellulären Kopienzahl

Ausgehend von der photometrisch bestimmten Menge der Human-DNA wurde deren Kopienzahl wie folgt berechnet:

Durchschnittliches Molekulargewicht eines Basenpaares (bp):

1 bp: 660 g/mol

Berechnung des Durchschnittlichen Molekulargewichtes der Gesamt-DNA einer Zelle:

Die Gesamt-DNA einer Zelle besteht aus $3,3 \times 10^9$ bp, somit liegt deren Molekulargewicht bei $660 \text{ g/mol} \times 3,3 \times 10^9 = 2,18 \times 10^{12} \text{ g/mol}$.

Stoffmenge [mol] der jeweiligen DNA-Probe:

1 mol doppelsträngiger DNA: $2,18 \times 10^{12} \text{ g}$

1 μg doppelsträngiger DNA: $4,59 \times 10^{-19} \text{ mol}$

Umrechnung Stoffmenge zu Teilchenzahl (= Kopienzahl):

1 mol = $6,023 \times 10^{23}$ Teilchen (Avogadro-Konstante)

1 μg doppelsträngiger DNA enthält $2,76 \times 10^5$ Basenpaare.

Spektralphotometrische Konzentrationsmessung:

Die spektralphotometrische Bestimmung der DNA-Menge erfolgte unter der Annahme, dass 1 OD_{260} einer DNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ entspricht.

Bei einer gemessenen $\text{OD}_{260} = 0,6$ beträgt z.B. die DNA-Konzentration $0,6 \times 50 \mu\text{g/ml} = 0,03 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Bei der verwendeten Beispiel-DNA-Probe waren $2,76 \times 10^5$ Kopien $\times 0,03 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 8280$ Kopien/ μl DNA enthalten. Da pro Well jeweils 5 μl DNA-Probe verwendet wurden, lagen hier 41 400 Kopien DNA und somit 20 700 Zellen vor.

3.3.17 Lagerung der Substanzen

Substanz	Temperatur [°C]
Standardlösung (aliquotiert) 10^{11} - 10^7 Kopien	-70
Standardlösung (aliquotiert) 10^6 - 10^1 Kopien	-20
Primer und Sonde (aliquotiert)	-20
2x TaqMan® Universal PCR-Mastermix	4

Tabelle 8: Lagerung der Substanzen

3.4 Statistik

Das klinische Datenmanagement wurde unter einer in Microsoft® Excel 9.0 (Microsoft Corporation) aufgestellten Datenbank ausgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung im Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie (IBE) der LMU München mittels des Statistikprogramms SPSS® für Windows 9.0 (SPSS Inc. Headquarters, Chicago, Illinois).

Genaue Angaben zu den verwendeten statistischen Verfahren sind im Ergebnisteil an entsprechender Stelle zu finden. Da a priori nicht von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen werden konnte, wurde bei den somit als nicht parametrisch bezeichneten, mindestens als ordinal vorliegenden Daten für den Vergleich von zwei unverbundenen Stichproben der U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney, für den Vergleich von drei oder mehr unverbundenen Stichproben die Kruskal-Wallis-Analyse angewendet. Das Signifikanzniveau wurde jeweils bei $p = 0,05$ festgelegt.

Zur Beurteilung des Zusammenhangs verschiedener nominaler Parameter wurden Kreuztabellen gebildet, deren wesentliche Aussagen auch im Ergebnisteil genannt sind. Das statistische Testen der Häufigkeitsverteilungen von nominal dichotomisierten oder trichotomisierten Variablen erfolgte mittels des Vierfelder- χ^2 -Tests (Chi-Quadrat-Test). Als Signifikanzniveau wurde analog des Testens der anderen Parameter $p = 0,05$ gewählt.

Die deskriptive Darstellung der Ergebnisse erfolgte in ausgewählten Fällen auch graphisch. Dabei wurden folgende Maßzahlen in Boxplots dargestellt: Median, 25. und 75. Perzentile (Quartilen), Minimum und Maximum.

Alle relevanten, nicht im Ergebnisteil dargestellten Daten sind im Anhang tabellarisch abgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Entwicklung einer Real-time PCR zur Bestimmung der HHV-8 Viruslast

4.1.1 Skalierte Farbintensitäten einer TaqMan®-Versuchsreihe

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 21 Versuchsreihen auf einem TaqMan® ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System durchgeführt.

Nach erfolgter Definierung der einzelnen Positionen einer Mikrotiterplatte, Programmierung des Thermocyclers und Durchführung der Amplifikation erfolgte die Analyse der Rohdaten, wobei die Ergebnisse sowohl graphisch wie auch numerisch aufgerufen werden konnten.

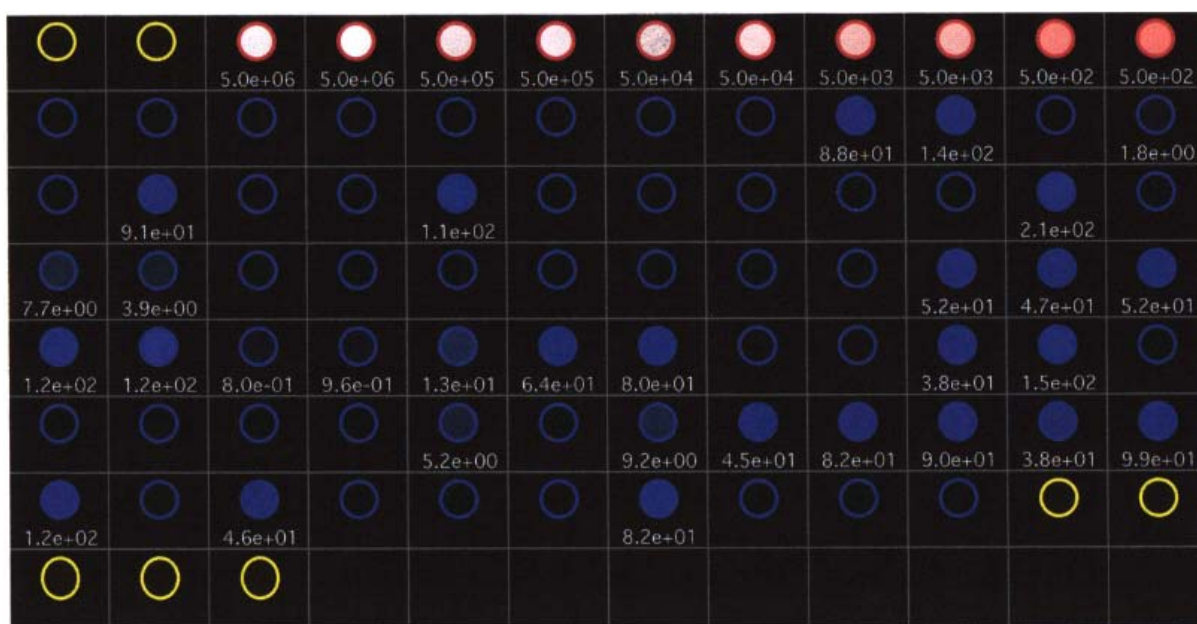


Abb. 4. Skalierte Farbintensitäten einer TaqMan® Versuchsreihe (96-well Platte) (Originalausdruck „ABI Prism Sequence Detection Systems 1.6.3“; P.E.Applied Biosystems, Weiterstadt). Gelb markiert: NTC (= no template control = Negativkontrolle = H₂O). Rot markiert: Standard-Reihe (Konzentration: 1x10⁶ Geq/μl- 1x10² Geq/μl bzw. 5x10⁶ Geq/well- 5x10² Geq/well). Blau markiert: Proben (Konzentration: in Geq/well). Die Farbintensitäten der Kreise sind skaliert und spiegeln den R_N-Wert am Ende des PCR-Laufes für die jeweilige Position wieder. Jede Probe wurde in jeweils zwei nebeneinander liegende Wells pipettiert.

Bei den graphisch dargestellten Ergebnissen (Abb.4) erscheinen die Farbintensitäten der Kreise, die die jeweils belegten Positionen in der Mikrotiterplatte symbolisieren, skaliert und spiegeln den R_N-Wert, d.h. den Wert des normalisierten Reportersignals (Quotient der Emissionsintensität des Reporter-

farbstoffs dividiert durch die Emissionsintensität des passiven Referenzfarbstoffs) wieder. Die jeweils angegebenen Zahlen entsprechen den berechneten Startkopienzahlen, bezogen auf 5 µl DNA.

4.1.2 Standardverdünnungsreihe

4.1.2.1 Amplifikation

Die Darstellung der Amplifikation der Standardverdünnungsreihe des Referenzplasmids (ORF26 im Vektor pR SET a) erfolgte in logarithmischer Form (Abb.5).

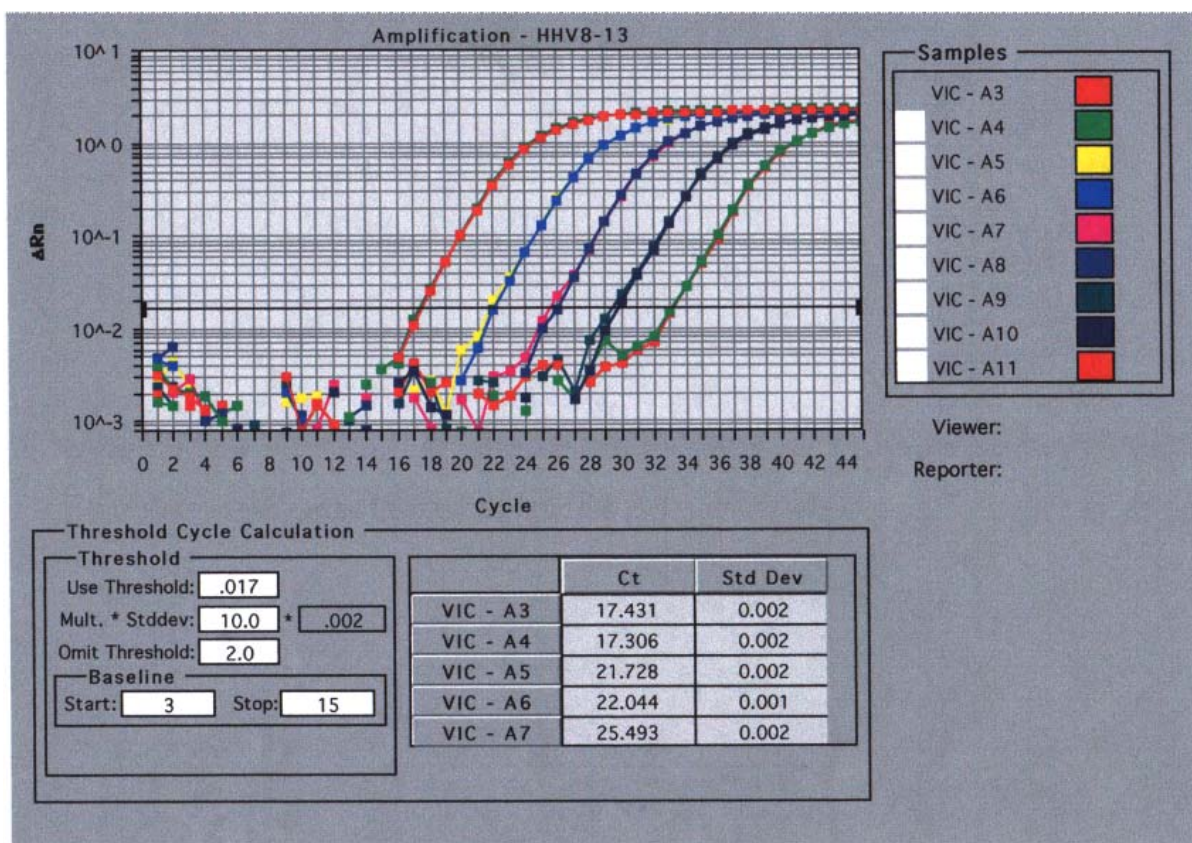


Abb. 5. Typische Amplifikationskurven von ORF26-Standardverdünnungen (Originalausdruck „ABI Prism Sequence Detection Systems 1.6.3“; P.E.Applied Biosystems, Weiterstadt). Der R_n -Wert minus dem Reporter-Signal vor der PCR, der sogenannte ΔR_n -Wert, wird für die Standardproben in logarithmischer Form dargestellt. Jede Konzentrationsstufe (von 5×10^6 Geq/well bis 5×10^2 Geq/well) wurde in doppelter Ausführung verwendet. Auf der x-Achse ist die Zykluszahl aufgeführt. Je höher die Konzentration, desto eher erscheint ein Signal. Die Konzentrationsstufe 5×10^6 Geq/well entspricht somit A3 und A4, die Konzentrationsstufe 5×10^2 Geq/well A10 und A11. Als Threshold (Schwellenwert) wurde ΔR_n von 0,017 berechnet.

4.1.2.2 Standardkurve

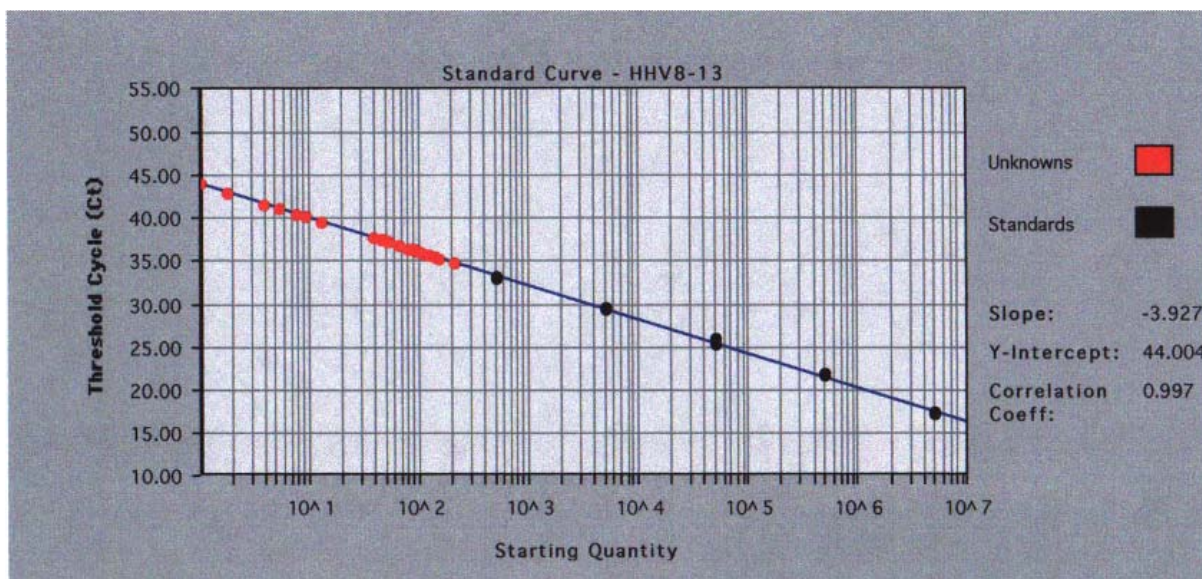


Abb. 6. Standardkurve der HHV-8 TaqMan[®] PCR: In der Standardkurve erscheinen die Werte der zu Reaktionsbeginn als Standards gekennzeichneten Proben. Die Standardkurve zeigt die C_T -Werte über den $\log N$ (natürlicher Logarithmus) der Startkopienzahl. Beim C_T -Wert, dem sogenannten Threshold Cycle handelt es sich um die Zyklenzahl, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über die Grundlinie erfasst wird. Rechts neben dem Graphen werden die berechnete Steigung (-3,927), der Y-Achsenabschnitt (44,004) und der Korrelationskoeffizient (0,997) angegeben.

Ein Korrelationskoeffizient der Standardkurve von $\geq 0,98$ wurde als Qualitätskriterium der Messungen herangezogen und nur Messungen, bei denen dies der Fall war, wurden statistisch ausgewertet.

4.1.2.3 Primer- und Magnesiumtitration

Zur Optimierung der Reaktionsergebnisse wurden zwei unterschiedliche Primerkonzentrationen, 200 mM und 600 mM je Probe, verwendet. Bei der höheren Primerkonzentration kam es nur zu einer geringfügig besseren Amplifizierung. Aufgrund möglicher unspezifisch amplifizierter DNA-Segmente bei höheren Konzentrationen und aufgrund hoher Kosten führten wir die Tests mit einer Primerkonzentration von 200 mM durch.

Auch bei der Optimierung der Magnesiumkonzentration ergab die ursprüngliche Konzentration (d.h. 5 mM) die gleichen Ergebnisse wie eine Magnesiumkonzentration von 9 mM, weswegen die ursprüngliche Magnesiumkonzentration von 5 mM in allen Versuchen beibehalten wurde.

4.1.3 Negativkontrollen

Bei den Negativkontrollen handelte es sich um steriles, DNA-freies Wasser. Nur wenn deren Werte unter dem errechneten Threshold liegen, kann der Versuch als richtig durchgeführt betrachtet werden (Abb.7).

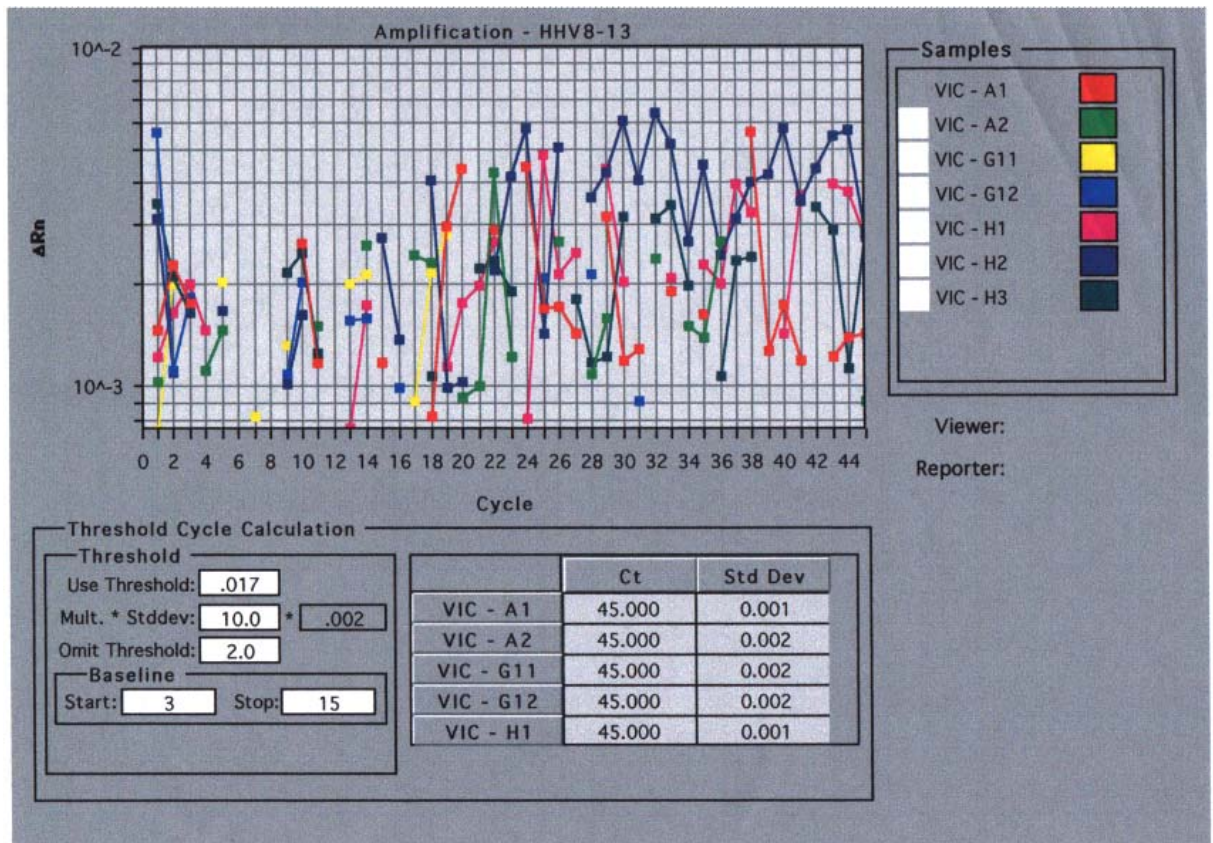


Abb. 7. Negativkontrollen: In Abb. 7 wird der ΔR_n -Wert für die Negativkontrollen (H_2O) dargestellt. Durch die Berechnung des ΔR_n -Wertes werden weitere Schwankungen, die nicht auf dem PCR-abhängigen Nukleaseverdau basieren, ausgeglichen, indem das binnen der ersten PCR-Zyklen erstellte Hintergrundsignal vom jeweiligen R_n -Wert abgezogen wird. Alle Signale liegen unter dem bei 0,017 festgelegten Threshold und sind somit unspezifisch.

4.1.4 Statistische Daten der HHV-8 Viruslastmessung

Von den 234 untersuchten Proben fielen 132 Proben positiv für den HHV-8 TaqMan[®] PCR-Test aus, bei 102 Proben konnte keine HHV-8 DNA nachgewiesen werden. Positiv bedeutete in diesem Fall > 0 , auf das Festlegen eines Cut-Off wurde verzichtet. Die ermittelte HHV-8 Viruslast betrug zwischen 1 Geq (HHV-8)/ 1×10^4 Zellen und 457 079 Geq (HHV-8)/ 1×10^4 Zellen, wobei der Median bei 23 Geq (HHV-8)/ 1×10^4 Zellen lag.

4.1.5 Bestimmung der eingesetzten Zellzahl mittels TaqMan® PCR für Housekeeping Gene

4.1.5.1 Ermittlung der zellulären Kopienzahl mittels TaqMan® PCR

Da bei der Isolierung der DNA-Proben aus peripherem Blut keine genaue Messung der DNA-Konzentration erfolgte, war eine nachträgliche genaue Quantifizierung notwendig. Hierzu bedienten wir uns der Tatsache, dass sogenannte Housekeeping Gene wie zum Beispiel Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) oder „human acidic ribosomal protein“ in jeder Zelle in derselben Konzentration vorkommen und somit unabhängig von dem Aktivitätsgrad der jeweiligen Zellen sind.

Die quantitative Bestimmung der ursprünglichen Zellzahl jeder Patientenprobe erfolgte mit Hilfe des Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents Control Kit für das „human acidic ribosomal protein“. Hierfür wurden acht verschiedene, willkürlich ausgewählte Patientenproben untersucht und mithilfe einer vorgefertigten Standardverdünnungsreihe quantifiziert. Durch Erstellen einer Standardkurve der Standardverdünnungsreihe (siehe ORF26 Standardverdünnungsreihe) und damit einer Gleichung für die Standardkurve konnte die DNA-Menge und somit die Ausgangskonzentrationen der Patientenproben ermittelt werden. Dabei wurden die C_T -Werte der Standardreihe mit den C_T -Werten der Patientenproben verglichen. Die Steigung der Standardkurve betrug -3,917, der Korrelationskoeffizient lag bei 0,996.

4.1.5.2 Vergleich der spektralphotometrischen Konzentrationsmessung mit der mittels TaqMan® ermittelten zellulärer DNA-Konzentration

Insgesamt wurden die Konzentrationen von acht verschiedenen DNA-Proben sowohl mittels TaqMan® als auch spektralphotometrisch bestimmt (siehe Material und Methoden) und miteinander verglichen. Der für die Beispielprobe mittels TaqMan® ermittelte Wert betrug 32 000 Kopien DNA pro well.

Graphisch wurde dieser Vergleich als Diagramm (Abb.8) aufgezeichnet, bei dem die mittels TaqMan® PCR ermittelte Human-DNA-Kopienzahl gegen die spektralphotometrisch ermittelte OD_{260} aufgetragen wurden. Die berechnete Steigung und somit der Korrelationskoeffizient betrug $1,0277 \times 10^{-5}$. Im Anschluss konnte mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten annähernd die jeweilige DNA-Kopienzahl jeder Probe aus der gemessenen OD_{260} berechnet werden.

Da jede humane Zelle zwei Kopien jedes Chromosoms enthält, entsprach die berechnete DNA-Kopienzahl dem zweifachen der in der Probe (d.h. 5µl) enthaltenen Zellzahl. Die mittels TaqMan® PCR ermittelte HHV-8 Viruslast wurde auf eine Kopienzahl von 1×10^4 bezogen.

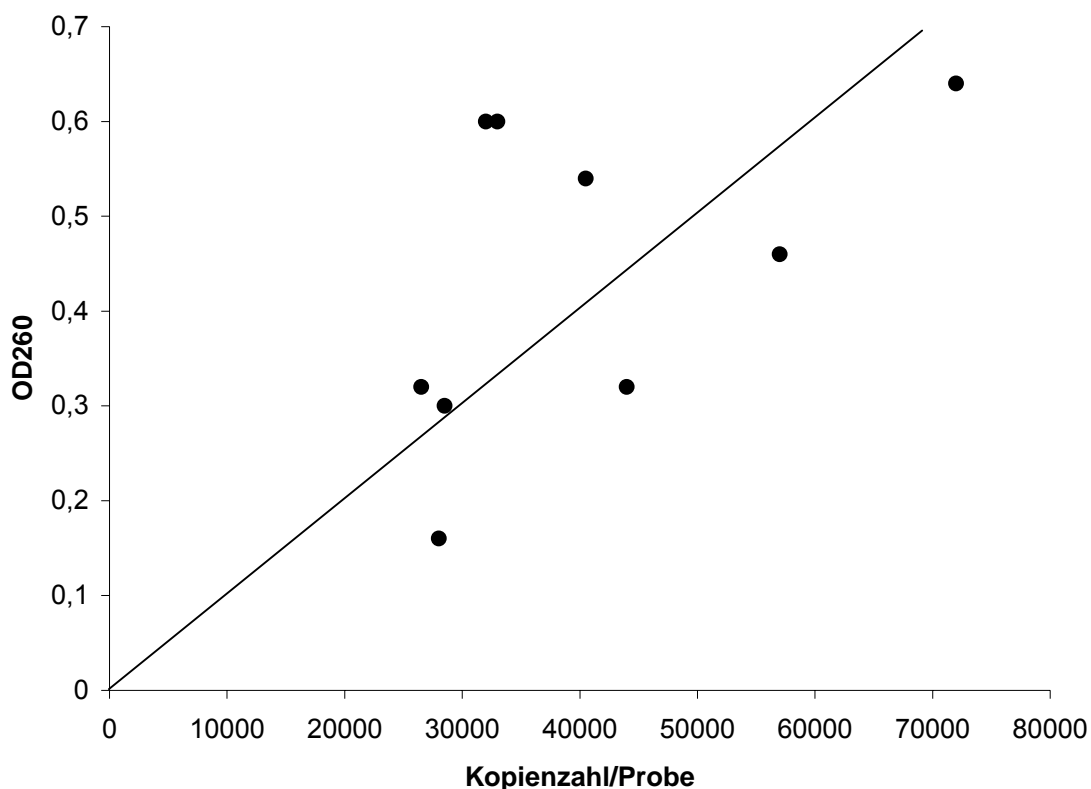


Abb. 8. Bestimmung der Zellzahl mittels TaqMan[®] PCR für das „human acidic ribosomal protein“; Messung mittels Spektralphotometer (angegeben in OD₂₆₀) und mittels TaqMan[®] (angegeben in Kopienzahl pro Probe)

4.2 Untersuchtes Patientenkollektel

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 234 Blutproben von insgesamt 121 Patienten (106 männlich, entspricht 87,6%; 15 weiblich, entspricht 12,4%) ausgewertet, die von 1993 bis 1999 aufgrund einer nachgewiesenen HIV-Infektion in der Infektionsambulanz und Tagesklinik der Medizinischen Poliklinik der LMU München (Leitung: Prof. Dr. med. Frank D. Goebel, Oberarzt: Prof. Dr. med. Johannes Bogner) betreut wurden. Weitere schon bereits bekannte Daten wie HIV Viruslast, CD4- und CD8-Zellzahl, Einnahme von (HA)ART oder von gegen Herpesviren wirksamen Medikamenten (Aciclovir, Ganciclovir, Foscarnet) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. med. Johannes Bogner und Dr. rer. nat. Oktavian Schatz zur Verfügung gestellt. In der Auswertung wurde nicht berücksichtigt, dass von einigen Patienten mehrere Proben von unterschiedlichen Abnahmetermenen vorlagen. Jede Probe wurde somit zur Vermeidung von unnötiger Unübersichtlichkeit aufgrund vieler sich auf die Datenzusammenhänge auswirkender Faktoren (wie z.B. Einnahme von HAART zur Zeit der Probenentnahme) separat betrachtet.

Von 234 Proben stammten 31 Proben von insgesamt 21 Patienten, die zur Zeit der Probenentnahme oder in der Vorgeschichte an einem Kaposi-Sarkom (kutan, pulmonal oder intestinal) erkrankt waren. Unter den 234 Proben konnte in 101 Fällen keine HIV-RNA mittels PCR nachgewiesen werden, bei 133 hingegen lag die Kopienzahl über der Nachweisgrenze von $10^{2,7}$ Geq/ μ l.

Bei 206 Proben handelte es sich um Proben von Patienten, die über mindestens 12 Wochen lang vor der Probenentnahme und zumindest bis 4 Wochen vorher eine highly active antiretroviral therapy (HAART) eingenommen haben; bei 28 Proben lag hingegen keine HAART-Einnahme vor. Da HAART erst im Jahre 1997 eingeführt wurde und die Etablierung schrittweise vorstatten ging, wurde auf eine Differenzierung zwischen der Einnahme von 1 oder 2 antiretroviral wirksamen Medikamenten (ART) und der Einnahme einer Dreierkombination (HAART) verzichtet.

Auf eine Differenzierung der Patienten bezüglich der HIV-Infektionsquelle in Risikogruppen wie Drogenabhängige, Homosexuelle oder Blutprodukt-Empfänger wurde aufgrund diesbezüglich fehlender Daten verzichtet.

Weitere statistische Daten werden im folgenden in den jeweiligen Abschnitten aufgeführt.

4.2.1 Korrelation zwischen der HHV-8 Viruslast und der Kaposi-Sarkom Inzidenz

Von den 31 Proben von Patienten mit einem Kaposi-Sarkom konnte in 20 Fällen HHV-8 mittels der TaqMan[®] PCR detektiert werden, in 11 Fällen interessanterweise hingegen nicht. Vergleicht man die HHV-8 Viruslast der KS-Gruppe mit der HHV-8 Viruslast der Nicht-KS-Gruppe, so ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Höhe der Viruslast ($p = 0,328$; U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney).

	HHV-8 – (n)	HHV-8 + (n)	Gesamt (n)
Kaposi-Sarkom -	91	112	203
Kaposi-Sarkom +	11	20	31
Gesamt (n)	102	132	234

Tabelle 9: Kreuztabelle: Kaposi-Sarkom Vorkommen (Kaposi-Sarkom +) bei HHV-8 negativen (HHV-8 -) und bei HHV-8 positiven (HHV-8 +) Patienten (Gesamtkollektiv)

4.3 Korrelation zwischen der HIV-1 Viruslast und der HHV-8 Viruslast

Im folgenden wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der HHV-8 Viruslast und der HIV Viruslast gibt.

Die Abbildung 8 zeigt die Korrelation zwischen der HHV-8 Viruslast und der HIV Viruslast. Patienten mit einer hohen HIV-1 Viruslast können sowohl eine niedrige als auch eine hohe HHV-8 Viruslast haben. In der Abbildung sind nur die Proben aufgeführt, bei denen sowohl HIV-1 als auch HHV-8 quantitativ nachweisbar waren.

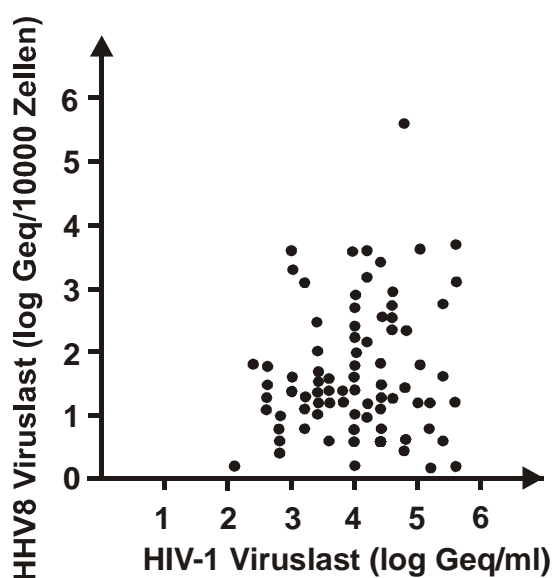


Abb. 9. Korrelation zwischen der HIV-1 Viruslast und der HHV-8 Viruslast: gezeigt sind nur die Proben, bei denen beide Viren quantitativ nachweisbar waren (Dot Plot)

Zur statistischen Auswertung wurde die HIV-1 Viruslast in drei Gruppen unterteilt. Die Gruppierung erfolgte in einer aus der klinischen Diagnostik übernommenen Skalierung: Gruppe 1 bildeten die Proben mit einer nicht nachweisbaren HIV-1 Viruslast (d.h. kleiner 500 Geq/ml), Gruppe 2 mit einer HIV-1 Viruslast zwischen 500 bis 30.000 Geq/ml, und Gruppe 3 mit einer HIV-1 Viruslast größer als 30.000 Geq/ml.

Von den 234 Proben waren bekanntlich 132 Proben HHV-8 positiv. 53 davon hatten keine nachweisbare HIV-1 Viruslast (Gruppe 1), weitere 53 besaßen eine niedrige HIV-1 Viruslast (Gruppe 2) und nur 26 der HHV-8 positiven hatten eine hohe Viruslast (Gruppe 3). In der Vergleichsgruppe der HHV-8 negativen Proben lag die Verteilung der HIV-1 Viruslast ähnlich: Unter den 102 Proben

lagen 47 unter der Nachweisgrenze, 37 im Bereich der niedrigen HIV-1 Viruslast und nur 18 hatten eine hohe HIV-1 Viruslast.

Zwischen den beiden Viruslasten zeigte sich tendenziell eine leichte Korrelation, die statistisch jedoch nicht signifikant war ($p = 0,487$; Kruskal-Wallis-Analyse). Eine niedrige HIV-1 Viruslast schloss eine hohe HHV-8 Viruslast nicht aus. Somit kann man für unsere Untersuchungsgruppe sagen, dass ein bezüglich der HIV-1 Viruslast gut eingestellter Patient dennoch eine hohe HHV-8 Viruslast haben kann.

4.3.1 Korrelation zwischen der HIV-1 Viruslast und der HHV-8 Viruslast in Abhängigkeit von (HA)ART

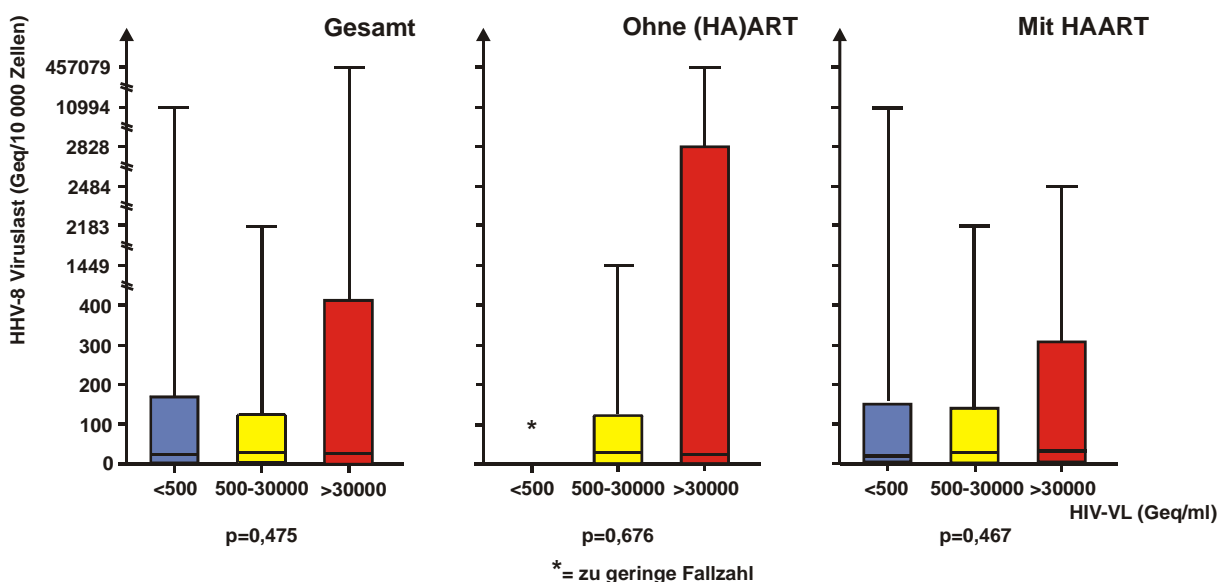


Abb. 10. Einfluss der anti-retroviralen Therapie (HAART) auf den Zusammenhang zwischen HIV-1 Viruslast und HHV-8 Viruslast (Box-and-Whisker-Plot)

Im Gesamtkollektiv der HHV-8 positiven Proben zeigte sich eine leichte Tendenz einer Korrelation zwischen der HIV-1 Viruslast und der HHV-8 Viruslast ($p = 0,475$; Kruskal-Wallis-Analyse). Auch im Kollektiv der HHV-8 positiven Proben, die unter dem Einfluss von (HA)ART standen, war ersichtlich, dass durchschnittlich die HHV-8 Viruslast bei hohen HIV-1 Viruslasten höher ist als bei Proben, bei denen HIV-1 mittels PCR nicht nachweisbar war ($p = 0,467$; Kruskal-Wallis-Analyse). Besonders offensichtlich schien die Korrelation zwischen hoher HIV-1 Viruslast und hoher HHV-8 Viruslast jedoch in der Gruppe der HHV-8 positiven Proben zu sein, die nicht mit (HA)ART therapiert wurden. Beim Vergleich der maximalen HHV-8 Viruslast der Gruppe 2 (HIV-1 Viruslast zwischen 500 bis 30.000 Geq/ml) mit 1449 Geq/10.000 Zellen und der

Gruppe 3 (HIV-1 Viruslast über 30.000 Geq/ml) mit 457.097 Geq/10.000 Zellen wurde die Tendenz ersichtlich. Aufgrund einer sehr niedrigen Fallzahl in der Gruppe 1, d.h. der Gruppe, deren HIV-1 Viruslast in der PCR nicht messbar war (nur 1 Probe vorhanden), war jedoch keine statistisch signifikante Aussage möglich ($p = 0,676$; Kruskal-Wallis-Analyse).

Zusammenfassend ist trotz einer fehlenden statistischen Signifikanz aus dem Diagramm (Abb. 9) ersichtlich, dass besonders im Falle der Patientengruppe ohne (HA)ART eine Tendenz zur Korrelation zwischen der HHV-8 Viruslast und der HIV-1 Viruslast beobachtet werden konnte.

4.4 Korrelation zwischen der CD4-Zellzahl und der HHV-8 Viruslast

Die im Jahre 1993 von den Centers for Disease Control (CDC) veröffentlichte Stadieneinteilung der HIV-Infektion enthält sowohl klinische als auch labor-diagnostische Kategorien (siehe Einleitung).

Die dort festgesetzte Unterteilung der CD4-Lymphozyten Zellzahl in drei Gruppen wurde übernommen.

Von den 234 Proben lag bei 77 Proben die CD4-Zellzahl unter $200/\mu\text{l}$ (= Gruppe 1) und bei 157 Proben über $200/\mu\text{l}$, wobei davon bei 113 Proben die CD4-Zellzahl zwischen 200 und $499/\mu\text{l}$ (= Gruppe 2) und bei 44 Proben über $500/\mu\text{l}$ (= Gruppe 3) ermittelt wurde.

Die höchste HHV-8 Viruslast wurde erwartungsgemäß bei einem Patienten gemessen, dessen CD4-Zellzahl unter $200/\mu\text{l}$ lag.

Unter den 132 Proben, die HHV-8 positiv in der TaqMan[®] PCR waren, gehörten 46 Proben der Gruppe 1, 57 der Gruppe 2 und 29 der Gruppe 3 an. Der Median der HHV-8 Viruslast der Gruppe 1 lag bei $35 \text{ Geq}/1 \times 10^4$ Zellen, die 75. Perzentile bei $391 \text{ Geq}/1 \times 10^4$ Zellen, die 25. Perzentile bei $13 \text{ Geq}/1 \times 10^4$ Zellen.

In der Gruppe 2 waren $10994 \text{ Geq}/1 \times 10^4$ Zellen der höchstgemessene Wert, der Median betrug $32 \text{ Geq}/1 \times 10^4$ Zellen, die 75. Perzentile $145 \text{ Geq}/1 \times 10^4$ Zellen und die 25. Perzentile $7 \text{ Geq}/1 \times 10^4$ Zellen.

Erwartungsgemäß lag in der Gruppe 3 der Median nur noch bei $9 \text{ Geq}/1 \times 10^4$ Zellen, der Maximalwert lag bei $2183 \text{ Geq}/1 \times 10^4$ Zellen, die 75. Perzentile bei nur $31 \text{ Geq}/1 \times 10^4$ Zellen und die 25. Perzentile bei $3 \text{ Geq}/1 \times 10^4$ Zellen. Hierbei zeigte sich, dass die CD4-Zellzahl negativ mit der HHV-8 Viruslast korrelierte ($p = 0,010$, Kruskal-Wallis-Analyse). Dies bedeutet, dass durch eine zunehmende Immunschwäche im Verlauf einer HIV-Erkrankung neben der HIV-1 Viruslast auch die HHV-8 Viruslast ansteigt.

Interessanterweise ergab neben der Trichotomisierung auch eine Dichotomisierung der CD4-Zellzahl sowohl in eine Gruppe mit einer CD4-Zellzahl kleiner 500/ μ l und in eine Gruppe größer 500/ μ l ($p = 0,040$, U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney) als auch in eine Gruppe mit einer CD4-Zellzahl kleiner oder größer 200/ μ l ($p = 0,039$, U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney) einen signifikanten Unterschied der HHV-8 Viruslast.

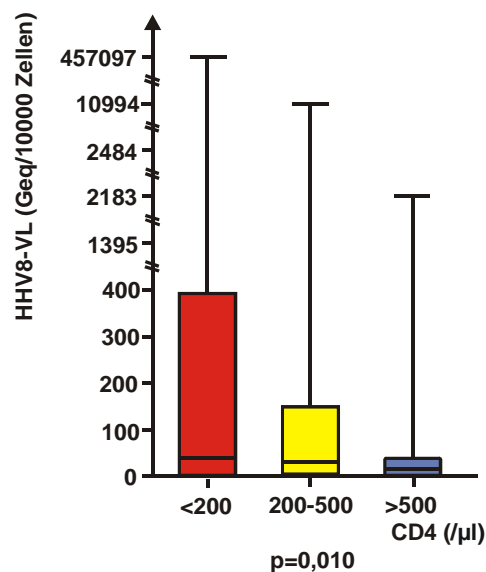


Abb. 11. Abhängigkeit der HHV-8 Viruslast von der CD4-Zellzahl

Im gesamten Kollektiv, d.h. bei den HHV-8 positiven und negativen Proben, fiel auf, dass die Verteilung der HHV-8 positiven Proben auf die drei CD4-Gruppen keine Signifikanz bezüglich der Viruslast in Korrelation zur CD4-Zellzahl aufwiesen ($p = 0,26$, Kruskal-Wallis-Analyse). Somit haben erwartungsgemäß Patienten mit niedrigeren CD4-Zellzahlen eine höhere HHV-8 Viruslast.

4.5 (HA)ART Therapie

4.5.1 Korrelation zwischen der (HA)ART Therapie und der HHV-8 Viruslast

Alle DNA-Proben von Patienten, die zur Zeit der Probengewinnung und mindestens 12 Wochen vorher regelmäßig Medikamente einnahmen, die die HIV-1 Viruslast senken konnten, fielen in die Gruppe der Patienten mit (HA)ART Therapie. Dabei wurde nicht differenziert, welche Medikamente eingenommen wurden. Die einzige Bedingung war die Einnahme von einem (vor Einführung der HAART 1997) oder mehreren (HAART) anti-retroviral wirksamen Medikamenten. Alle anderen Proben, somit auch Proben, deren Patienten anti-retrovirale Medikamente weniger als 3 Monate eingenommen hatten, wurden zu der Gruppe der nicht-therapierten Patienten gezählt.

Eine direkte Wirkung von (HA)ART auf die HHV-8 Viruslast konnte nicht belegt werden. Von insgesamt 234 Proben gehörten 102 zu der Gruppe, bei denen kein HHV-8 nachgewiesen werden konnte, 132 hingegen zur HHV-8 positiven Gruppe. Von den 102 HHV-8 negativen Proben erhielten 83 der entsprechenden Patienten eine (HA)ART, 19 dagegen keine. 95 Proben der HHV-8 positiven Gruppe standen unter Therapie, 37 hingegen waren therapie-naiv. Statistisch betrachtet ergab sich keine Korrelation zwischen der Gruppe mit (HA)ART und einer nachweisbaren HHV-8 Viruslast ($p = 0,370$, Chi-Quadrat-Test nach Pearson), d.h. eine (HA)ART schließt eine nachweisbare oder positive HHV-8 Viruslast nicht aus bzw. senkt die HHV-8 Viruslast nicht unter die Nachweisgrenze.

Die anti-retrovirale Therapie in Form von HAART oder einer Mono-/Zweifachtherapie hat einen Einfluss auf die CD4-Zellzahl. Im folgenden wurde untersucht, inwieweit sich dieser Einfluss auch auf die HHV-8 Viruslast auswirkt. Dabei erfolgte erneut eine Unterteilung der CD4-Zellzahlen in drei Gruppen (siehe oben), die HHV-8 Viruslast wurde numerisch angegeben.

Insgesamt lagen 132 Proben vor, die in der TaqMan[®] PCR positiv für HHV-8 waren. Davon erhielten 95 (entspricht 72%) eine anti-retrovirale Therapie, 37 (28%) hingegen nicht.

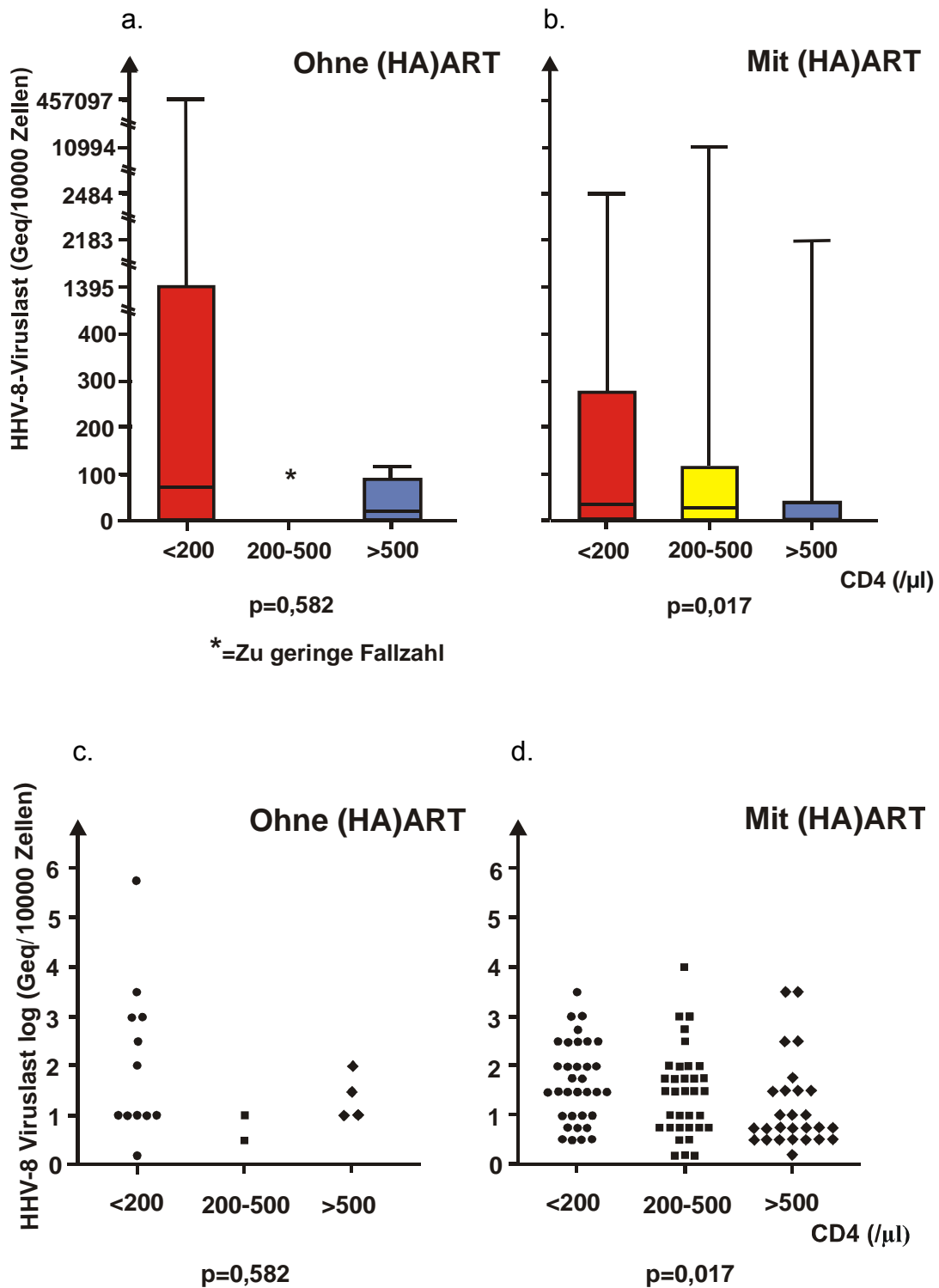


Abb. 12. Abhängigkeit der HHV-8 Viruslast von der CD4-Zellzahl bei Patienten ohne und mit (HA)ART

34 der Proben, die (HA)ART erhielten, hatten weniger als 200 CD4-Zellen/ μ l (Gruppe 1), 34 Proben zwischen 200 und 499 CD4-Zellen/ μ l (Gruppe 2), und 27 Proben über 500 CD4-Zellen/ μ l (Gruppe 3). Der Median lag in der ersten Gruppe bei 35 Geq/ 1×10^4 Zellen, bei 22 Geq/ 1×10^4 Zellen in der 2. Gruppe und bei 8 Geq/ 1×10^4 Zellen in der 3. Gruppe. Der Maximalwert lag bei 10.994 Geq/ 1×10^4 Zellen und gehörte erstaunlicherweise nicht zur CD4-Zellzahlgruppe 1 sondern zur Gruppe 2. Der Unterschied der HHV-8 Viruslast zwischen den drei CD4-Zellzahlgruppen war statistisch gesehen signifikant ($p = 0,017$): Je niedriger die CD4-Zellzahl, desto höher ist die HHV-8 Viruslast.

Von den 37 Proben, die (HA)ART-naiv waren, gehörten 12 zur CD4-Zellzahlgruppe 1, nur zwei zur Gruppe 2 und vier zur Gruppe 3. Der HHV-8 Viruslast-Median lag in der 1. Gruppe bei 73 Geq/ 1×10^4 Zellen, bei der 3. Gruppe bei 20,5 Geq/ 1×10^4 Zellen. In der 2. Gruppe konnte aufgrund der geringen Fallzahl von 2 Proben kein Median ermittelt werden. Ein Einfluss der CD4-Zellzahl auf die HHV-8 Viruslast war in dieser Gruppe nicht signifikant ($p = 0,582$).

4.6 Korrelation zwischen der Gabe von Virostatika und der HHV-8 Viruslast

In vitro haben Aciclovir, Ganciclovir oder Foscarnet auch eine virostatistische Wirkung auf die Replikation von HHV-8. Daher suchten wir bei den vorliegenden Proben nach einem möglichen Einfluss der oben genannten Medikamente auf die HHV-8 Viruslast. Zur Gruppe der Proben von Patienten mit virostatistischer Therapie zählten alle Proben der Patienten, die zur Zeit der Probenentnahme oder bis maximal einen Monat vor Probeentnahme eines der oben aufgeführten virostatistisch wirksamen Medikamente eingenommen haben. Zur Gruppe der nicht therapierten Proben alle anderen. Dabei wurde nicht berücksichtigt, ob eine virostatistisch wirksame Therapie möglicherweise eine langanhaltende (d.h. weit über die Dauer der Einnahmezeit) Wirkung auf die HHV-8 Viruslast hat.

4.6.1 Aciclovir

Von den 234 Proben gehörten 174 Proben zur Gruppe der Aciclovir-naiven Patienten (Gruppe 1), 60 hingegen bekamen eine Aciclovir-Therapie (Gruppe 2). Von den 132 HHV-8 positiven Proben zählten 30 zu den mit Aciclovir therapierten, 102 Proben zu den nicht mit Aciclovir therapierten. Der Median der Aciclovir-naiven Gruppe lag bei 24 Geq/ 1×10^4 Zellen, bei den mit Aciclovir therapierten bei 20 Geq/ 1×10^4 Zellen. Die 75. Perzentile in der Gruppe 1 betrug 185 Geq/ 1×10^4 Zellen, die der Gruppe 2 158 Geq/ 1×10^4 Zellen. In den Maximalwerten gab es einen großen Unterschied: In der 2. Gruppe lag er bei 1966 Geq/ 1×10^4 Zellen, in der ersten hingegen bei 457 079 Geq/ 1×10^4 Zellen.

Eine Korrelation zwischen der Aciclovir-Therapie und der Höhe der HHV-8 Viruslast konnte nicht gezeigt werden ($p = 0,820$, Kruskal-Wallis-Analyse). Somit hat Aciclovir in unserer Studie keinen signifikanten Einfluss auf die HHV-8 Viruslast.

4.6.2 Ganciclovir

Unter den 132 HHV-8 positiven Proben erhielten nur 7 Ganciclovir (Gruppe 2), d.h. 125 waren Ganciclovir-naiv (Gruppe 1). Der Median der Gruppe 1 lag bei $22 \text{ Geq}/1 \times 10^4$ Zellen, der der Gruppe 2 bei $94 \text{ Geq}/1 \times 10^4$ Zellen. Auch hier zeigte sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Einnahme von Ganciclovir und der HHV-8 Viruslast, d.h. auch Ganciclovir senkte in unserer Studie nicht die HHV-8 Viruslast. Beim Betrachten der Mediane der beiden Gruppen lag er bei der Gruppe, die Ganciclovir erhalten hatte, sogar höher als bei der naiven Gruppe.

4.6.3 Foscarnet

130 der HHV-8 positiven Proben waren Foscarnet-naiv, nur zwei Proben gehörten zu Patienten, die mit Foscarnet zur Zeit oder bis maximal einen Monat vor der Probenentnahme therapiert wurden. Somit war eine statistische Aussage aufgrund einer zu niedrigen Fallzahl der Foscarnet-positiven Proben nicht möglich.

4.6.4 Zusammenfassung

Keines der *in vitro* wirksamen Virostatika hatte in unserer Studie einen Einfluss auf die HHV-8 Viruslast. Das als am ehesten wirksam beschriebene Foscarnet konnte aufgrund einer zu niedrigen Fallzahl nicht ausreichend beurteilt werden.

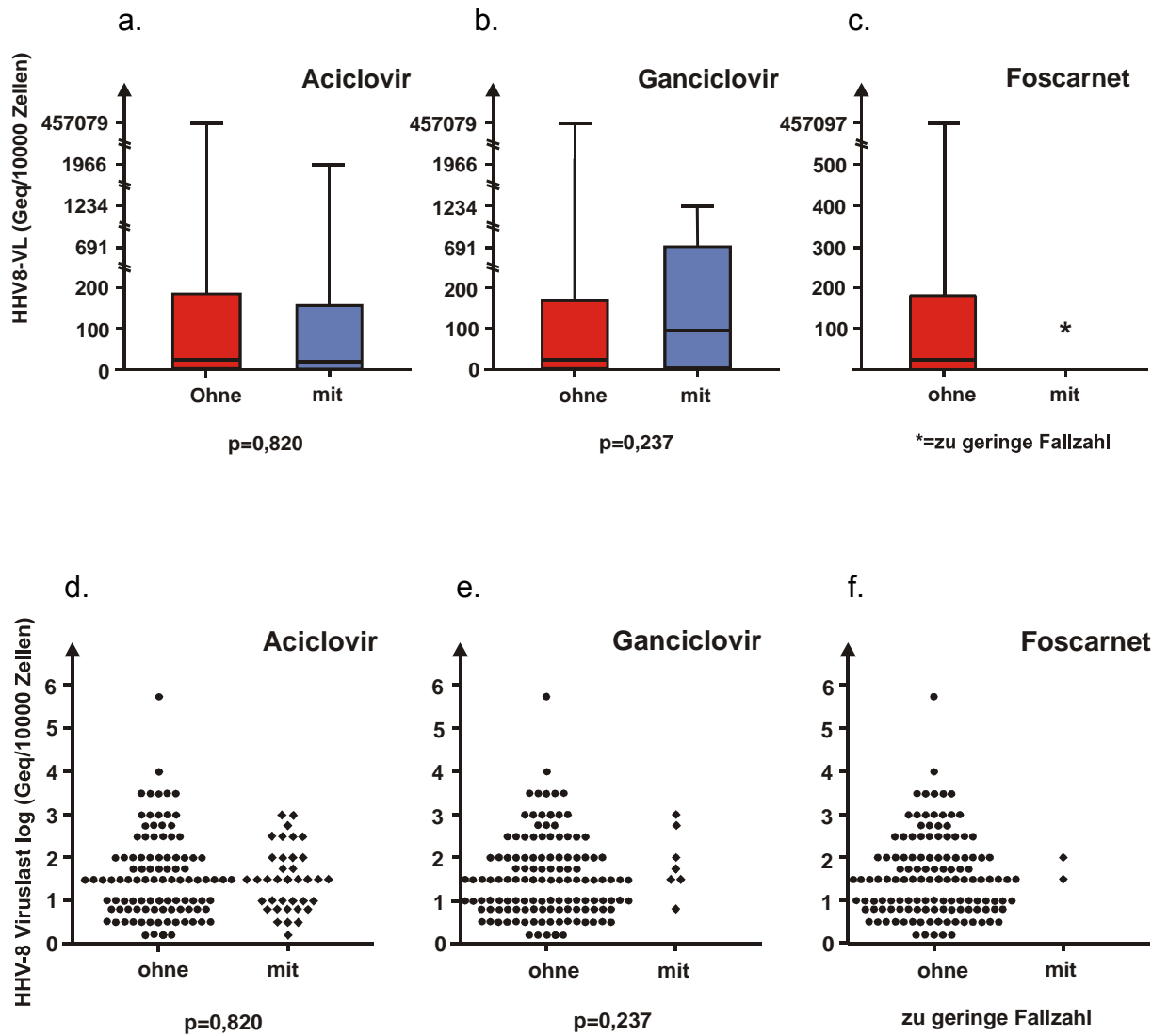


Abb. 13. Einfluss virostatisch wirksamer Medikamente auf die HHV-8 Viruslast

4.7 Korrelation zwischen der Einnahme virostatischer/anti-retroviraler Therapeutika und der KS-Inzidenz

Im folgenden wurde eine mögliche Korrelation zwischen der Einnahme virostatischer oder anti-retroviral wirksamer Medikamente und des Auftretens von Kaposi-Sarkomen untersucht. Dabei wurde sowohl das Gesamtkollektiv, d.h. alle untersuchten Proben, als auch nur die in der TaqMan[®] PCR für HHV-8 positiv ausgefallenen Proben untersucht.

Im Gesamtkollektiv gab es 31 Proben von KS-Patienten, in der Gruppe der HHV-8 positiven Gruppe hingegen nur 20 Proben. Somit konnte bei 11 Proben, die klinisch gesichert mit HHV-8 infiziert waren, kein HHV-8 in der durchgeführten PCR nachgewiesen werden.

4.7.1 Aciclovir

14 Patienten des Gesamtkollektivs mit einem Kaposi-Sarkom erhielten zur Zeit der Probenentnahme eine Aciclovirtherapie, 17 der insgesamt 31 KS-Proben hingegen nicht. Von 20 Patienten mit KS und positiver HHV-8 PCR erhielten nur 7 Aciclovir. In der Gruppe der HHV-8 positiven gab es keinen Zusammenhang zwischen der Einnahme von Aciclovir und dem Auftreten eines KS. Beim Gesamtkollektiv hingegen zeigte sich, dass die Patienten, die Aciclovir aufgrund einer Erkrankung mit dem Herpes-Simplex-Virus (HSV) erhielten, auch häufiger ein Kaposi-Sarkom entwickelten ($p = 0,008$; Chi-Quadrat-Test nach Pearson).

	Aciclovir – (n)	Aciclovir + (n)	Gesamt (n)
Kaposi-Sarkom -	157	46	203
Kaposi-Sarkom +	17	14	31
Gesamt (n)	174	60	234

Tabelle 10: Kreuztabelle: Kaposi-Sarkom Vorkommen in Abhängigkeit von Aciclovir
Kaposi-Sarkom Vorkommen (Kaposi-Sarkom +) bei Aciclovir therapierten (Aciclovir +) und bei nicht-Aciclovir therapierten (Aciclovir -) Patienten (Gesamtkollektiv)

4.7.2 Ganciclovir

27 Proben des Gesamtkollektivs gehörten zu Patienten, die ohne Ganciclovir ein KS entwickelten, 4 dagegen entwickelten unter Ganciclovir ein KS ($p = 0,113$).

	Ganciclovir – (n)	Ganciclovir + (n)	Gesamt (n)
Kaposi-Sarkom -	192	11	203
Kaposi-Sarkom +	27	4	31
Gesamt (n)	219	15	234

Tabelle 11: Kreuztabelle: Kaposi-Sarkom Vorkommen in Abhängigkeit von Ganciclovir
Kaposi-Sarkom Vorkommen (Kaposi-Sarkom +) bei Ganciclovir therapierten (Ganciclovir +) und bei nicht-Ganciclovir therapierten (Ganciclovir -) Patienten (Gesamtkollektiv)

Unter den Patienten mit positiver HHV-8 PCR erhielt nur ein Patient mit Kaposi-Sarkom Ganciclovir, die restlichen 19 Patienten mit Kaposi-Sarkom waren Ganciclovir-naiv ($p = 0,948$).

In beiden Kollektiven zeigte sich somit kein signifikanter Einfluss von Ganciclovir auf die Entwicklung des Kaposi-Sarkoms.

4.7.3 Foscarnet

6 der insgesamt 31 Proben, die zu Patienten mit Kaposi-Sarkom gehörten, erhielten Foscarnet, 25 hingegen nicht. Eine statistische Auswertung mittels des Chi-Quadrat-Testes nach Pearson ergab keinen Hinweis auf eine statistische Signifikanz ($p = 0,632$).

	Foscarnet – (n)	Foscarnet + (n)	Gesamt (n)
Kaposi-Sarkom -	200	3	203
Kaposi-Sarkom +	25	6	31
Gesamt (n)	225	9	234

Tabelle 12: Kreuztabelle: Kaposi-Sarkom Vorkommen in Abhängigkeit von Foscarnet
Kaposi-Sarkom Vorkommen (Kaposi-Sarkom +) bei Foscarnet therapierten (Foscarnet +) und bei nicht-Foscarnet therapierten (Foscarnet -) Patienten (Gesamtkollektiv)

Betrachtet man die Proben, die in der TaqMan[®] PCR positiv für HHV-8 waren, zeigten sich ähnliche Zahlen: Unter den 130 Proben, die kein Foscarnet erhalten haben, lag die KS-Rate bei 19, bei den 2 Proben mit Foscarnet gehörte die eine zu einem Patienten mit KS und eine zu einem Patienten ohne KS. In diesem Kollektiv hatte die Einnahme von Foscarnet ebenso keinen Einfluss auf die Entwicklung eines KS.

4.7.4 (HA)ART

Zuletzt wurde der Einfluss von (HA)ART auf die Entwicklung eines Kaposi-Sarkoms untersucht. Von den 31 Patienten mit Kaposi-Sarkom erhielten 25 eine (HA)ART-Therapie, nur 6 Patienten nicht ($p = 0,174$; Chi-Quadrat-Test nach Pearson).

	HAART – (n)	HAART + (n)	Gesamt (n)
Kaposi-Sarkom -	22	181	203
Kaposi-Sarkom +	6	25	31
Gesamt (n)	28	206	234

Tabelle 13: Kreuztabelle: Kaposi-Sarkom Vorkommen in Abhängigkeit von HAART
Kaposi-Sarkom Auftreten (Kaposi-Sarkom +) bei anti-retroviral therapierten (HAART +) und bei nicht-anti-retroviral therapierten (HAART -) Patienten (Gesamtkollektiv)

Von den in der quantitativen HHV-8 PCR 20 positiven Proben erhielten 15 eine anti-retrovirale Therapie, 5 hingegen nicht. Auch in dieser Gruppe gab es keinen signifikanten Einfluss von (HA)ART auf die Nichtentwicklung eines Kaposi-Sarkoms ($p = 0,108$; Chi-Quadrat-Test nach Pearson). Somit war keine Korrelation zwischen (HA)ART und der Entwicklung eines Kaposi-Sarkoms nachzuweisen.

5 Diskussion

5.1 Bestimmung der HHV-8 Viruslast mittels Real-time PCR

Die Real-time PCR wird in der medizinischen Diagnostik aufgrund ihrer Schnelligkeit und Sensitivität inzwischen häufig verwendet. Die Sensitivität beträgt bis zu einzelnen Virus-Kopien (Kennedy et al., 1997).

Vor Betrachtung der Ergebnisse sollte man nicht außer Acht lassen, dass bei asymptomatischen HHV-8 Trägern nur in 10 - 20% HHV-8 DNA mittels Nested PCR im peripheren Blut überhaupt nachweisbar ist (Bigoni et al., 1996; Viviano et al., 1997). Selbst bei der Primärinfektion ist nur in 10% der Fälle eine Virämie nachweisbar, die in etwa zeitgleich mit der Serokonversion auftritt (Goudsmit J. et al., 2000).

Lallemand und Mitarbeiter beschrieben eine HHV-8 Viruslast zwischen 0 und $9.171 \text{ Kopien}/10^6 \text{ Zellen}$ bei Patienten mit klinisch manifestem Kaposi-Sarkom (Lallemand et al., 2000). Bei MCD-Patienten stellten sie signifikant höhere Kopienzahlen fest, wobei die höchsten Werte bei klinisch symptomatischen Patienten auftraten und bei Beschwerderückgang wieder sanken. Bei MCD sind signifikant mehr Zellen lytisch infiziert, und die Virusreplikation ist höher als bei KS, welches die höhere Viruslast erklärt (Katano et al., 2000).

Auch im Rahmen unserer Studie wurde die höchste HHV-8 Viruslast ($457.079 \text{ Geq}/10^4 \text{ Zellen}$) bei einem Patienten gemessen, der an einem MCD erkrankt war. Ein Verlauf der HHV-8 Viruslast konnte leider nicht erstellt werden, da kurz nach Abnahme der ersten Probe der Patient an den Folgen des MCD verstarb. Laut Lallemand und Kollegen korreliert bei MCD die HHV-8 Viruslast mit den klinischen Symptomen und könnte demnach als Verlaufskontrolle angewandt werden (Lallemand et al., 2000).

5.1.1 Quantifikation der Zellzahl mittels Housekeeping Gene

Um die HHV-8 Viruslast der verschiedenen Patientenproben miteinander vergleichen zu können, war es nötig, die Viruslast bezogen auf eine bestimmte Zellmenge anzugeben. Die einfachste Methode, die Zellzählung, war nicht möglich, da die Isolierung der DNA schon stattgefunden hatte. Somit musste eine Methode gewählt werden, die geeignet war, nachträglich aus isolierter DNA die Zellzahl zu bestimmen. Dies gelang mit Hilfe einer quantitativen PCR, bei der das Housekeeping Gen für das „human acidic ribosomal protein“ gemessen wurde. Dabei ging man davon aus, dass bei allen Patienten die Expression dieses Gens annähernd äquivalent war. Es wurde jedoch berichtet,

dass die Menge der Housekeeping Gene von Individuum zu Individuum unterschiedlich sein kann (de Leeuw et al., 1989). Außerdem kann die Expression der Housekeeping Gene durch äußere Einwirkungen wie Medikamente, z.B. Dexamethason oder Hypoxie beeinflusst werden (Goidin et al., 2001; Zhong und Simons, 1999; Oikarinen et al., 1991). In Ermangelung anderer validerer Verfahren musste in der vorliegenden Studie die Zellzahl mithilfe des Pre-Developed TaqMan[®] Assay Reagents Control Kit für das „human acidic ribosomal protein“ ermittelt werden.

5.2 Einfluss der HHV-8 Viruslast auf die KS Inzidenz

In einer im Jahre 2002 durchgeführten Studie an 20 HHV-8 und HIV-positiven Patienten wurde festgestellt, dass die Remission bei KS mit einer Senkung der Viruslast assoziiert ist (Gill et al., 2002). In unseren Untersuchungen konnten wir keinen Zusammenhang zwischen der HHV-8 Viruslast und dem Auftreten von Kaposi-Sarkomen finden. In einigen Proben von Patienten mit klinisch manifestem Kaposi-Sarkom konnten wir HHV-8 mittels TaqMan[®] PCR nicht nachweisen. Bei schwerem Organbefall durch HHV-8 kann im peripheren Blut HHV-8 gar nicht nachweisbar sein. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die Infektion von peripheren mononuklearen Zellen (PBMC) durch HHV-8 zyklisch erfolgt und die Viruslast im peripheren Blut entsprechend unduliert. Eine andere Erklärung könnte aber auch darin liegen, dass die Virusreplikation und -aktivität nur lokal und nicht systemisch nachweisbar ist.

Möglicherweise lag es aber auch daran, dass in unserer Studie keine Unterteilung der KS in klinische Stadien erfolgte. Campell und Mitarbeiter stellten im Jahre 2000 in einer in Simbabwe durchgeführten Studie fest, dass das KS-Stadium mit der HHV-8 Viruslast korreliert (Campell et al., 2000). Bei einem KS in einem frühen klinischen Stadium war die Viruslast sehr niedrig bzw. nicht detektierbar, bei weit fortgeschrittenem KS hingegen sehr hoch. Ein weiterer wichtiger Unterschied bei der Durchführung der beiden Studien liegt darin, dass die Patienten in unserem Falle im Gegensatz zu der afrikanischen Studie meist unter (HA)ART oder unter virostatisch wirksamen Medikamenten standen und sich diese auf die HHV-8 Viruslast auswirken können (wenn auch nicht statistisch signifikant).

Zu beachten ist jedoch, dass sich die Wirkung der Medikamente nur bei Zellen zeigte, die sich in der lytischen Phase befanden. Auf latent infizierte Zellen zeigte keines der Virostatika eine Wirkung (Medveczky et al., 1997). *In vivo* sind aber die meisten Zellen in der latenten Phase und nur etwa 1-3% befinden sich der lytischen Phase (Staskus et al., 1997).

5.3 Einfluss der HIV-1 Infektion auf die HHV-8 Infektion

Unsere Studie beschränkte sich auf HIV-1-positive Patienten. Huang und Kollegen berichteten, dass die Inzidenzrate von KS unter HIV-1-positiven Patienten bis zu 100.000-fach höher ist als in der Allgemeinbevölkerung und bis zu 300-fach höher als bei anderen immunsupprimierten Patienten ist (Huang et al., 2001). Dieser Tatsache liegt zugrunde, dass mit HIV-1 infizierte Zellen einige Zytokine bilden können, die die lytische Replikation von HHV-8 stimulieren können, und gleichzeitig kann diese Replikation durch anti-retroviral wirksame Medikamente (Azidothymidin oder Indinavir) *in vitro* gehemmt werden (Varthakavi et al., 1999). Das von HIV-1 produzierte Tat Protein ist in der Lage, den Rezeptor für VEGF (vascular endothelial growth factor) zu aktivieren, wodurch die Spindelzellen des KS stimuliert werden (Morini et al., 2000). Zudem wurde beobachtet, dass Tat in der Lage ist, die durch Chemotherapeutika induzierte Zellapoptose HHV-8 infizierter Zellen zu verhindern (Deregibus et al., 2002). Obwohl HHV-8 und HIV-1 unterschiedliche Wirtszellen befallen, gibt es auch Berichte darüber, dass HHV-8 infizierte B-Lymphozyten auch mit HIV-1 infiziert werden können (Varthakavi et al., 1999). Zusammengefasst bedeutet dies, dass HIV-1 die Replikation von HHV-8 stimulieren kann. Dennoch konnten wir nicht mit statistischer Signifikanz zeigen, dass dieser Effekt an der Höhe der jeweiligen Virämien erkennbar ist. Auch Pellet und Mitarbeiter stellten keinen direkten Zusammenhang zwischen der HHV-8 und der HIV-1 Viruslast fest (Pellet et al., 1999).

In einer in Gambia durchgeführten Studie zeigte sich, dass KS nur bei Patienten auftrat, die mit HIV-1 infiziert waren. Das dort viel häufigere HIV-2 konnte nicht mit dem Auftreten von KS assoziiert werden (Ariyoshi et al., 1998).

5.4 Einfluss der (HA)ART Therapie auf die HHV-8 Infektion

5.4.1 (HA)ART Therapie

5.4.1.1 HAART versus ART

In der vorliegenden Arbeit wurde nicht zwischen einer HAART Therapie und einer Therapie mit nur einem oder maximal zwei anti-retroviral wirksamen Medikamenten (ART) unterschieden, da bis zum Jahre 1996 die Monotherapie mit AZT als Standard galt und zudem die Fallzahlen bei Trennung der Therapiegruppen in HAART und ART (d.h. Mono- oder Bitherapie) weitaus niedriger und somit die statistische Aussagekraft geringer gewesen wäre (Barlett et al., 1993). Klinisch betrachtet wäre diese Unterteilung sicherlich von großem Interesse, denn schon 1993 war klar, dass die Monotherapie große Defizite aufweist. In einer britisch-französischen Doppelblindstudie (CONCORDE-Trial) erhielten 1749 asymptomatische HIV-Infizierte entweder

täglich 1 g AZT oder Plazebo. Hinsichtlich Lebensalter, Geschlecht, Risikogruppenzugehörigkeit, Anzahl der T-Helferzellen und Zeit zwischen positivem HIV-Test und Behandlungsbeginn stimmten die Verum- und die Plazebogruppe überein. Zwar verfügten die mit AZT behandelten Patienten während der dreijährigen Studie über signifikant höhere CD4-Helferzellen, es fand sich jedoch kein Unterschied im klinischen Verlauf in beiden Gruppen. In der Verumgruppe lebten nach drei Jahren 92%, in der Plazebogruppe 93% der Patienten. In beiden Gruppen schritt die Krankheit bei jeweils 18% der Patienten bis zu AIDS fort oder endete tödlich. Die Anwendung von AZT alleine schob demnach die Erstmanifestation der AIDS-Erkrankung oder des sogenannten AIDS-related-complex nicht hinaus (Concorde Coordinating Committee, 1994).

Seit Einführung von HAART hingegen sank die Inzidenz von AIDS und die Mortalität rapide (CDC, 2000). Unter diesem Gesichtspunkt hätte auch die Möglichkeit bestanden, alle Proben vor 1996 - also auch die, deren Patienten eine Monotherapie bekommen haben - zur Gruppe der Therapienaiven zu zählen.

5.4.1.2 Therapieerfolg

Der Therapieerfolg einer HAART Therapie lässt sich nach virologischen, immunologischen und klinischen Kriterien beurteilen: Am frühesten erkennbar ist meist der virologische Therapieerfolg bzw. das virologische Therapieversagen.

Bei dem Erfolg bzw. Misserfolg einer HAART Therapie sollte jedoch nicht die Compliance vergessen werden. In einer Frankfurter Studie wurde festgestellt, dass auch Patienten mit einer Viruslastsenkung auf Werte unter 20 Kopien/ml ein beträchtliches Risiko (30%!) haben, noch während des ersten Therapiejahres mit der Viruslast auf >500 Kopien/ml wieder anzusteigen (Staszewski et al., 1998). Eine mögliche Erklärung ist eine unzureichende Compliance. Wenngleich die Autoren ausführen, dass "der klinische Eindruck diese Erklärung nicht unterstütze", ist doch bekannt, dass unabhängig von der Grunderkrankung und der Therapieform ein erheblicher Prozentsatz der Patienten nicht compliant ist.

In einer Untersuchung, die zur selben Zeit veröffentlicht wurde, berichtet eine Londoner Arbeitsgruppe über eine anonyme Fragebogenaktion mit 170 Patienten. Gefragt wurde nach der Compliance während des letzten Monats (Walsh et al., 1998). 14,5% der Patienten gaben an, weniger als 80% der Medikamente eingenommen zu haben. Weitere 18,8% hatten mindestens 10% der Medikamente ausgelassen. Nach dem derzeitigen Kenntnisstand zur Resistenzentwicklung bei unzureichender Suppression der HIV-Replikation ist

daher bei zahlreichen Patienten des Londoner Patientenkollektivs ein Wiederanstieg der Viruslast zu erwarten.

5.4.1.2.1 Virologischer Therapieerfolg

Unter einem virologischen Therapieerfolg wird allgemein verstanden, dass die Viruslast unter die Nachweisgrenze von 50 Kopien/ml absinkt. Dem liegt die Erkenntnis zugrunde, dass eine Therapie umso dauerhafter wirkt, je schneller und vor allem tiefer die Viruslast abfällt (Kempf et al., 1998). Die Viruslast sinkt unter einer HAART Therapie biphasisch - einem initial sehr raschen Abfall in den ersten Wochen folgt eine längere Phase, in der sich die Plasmavirämie nur allmählich reduziert. Ein Wert unterhalb der Nachweisgrenze sollte jedoch nach drei bis vier Monaten erreicht werden, bei initial sehr hoher Viruslast nach vier oder fünf Monaten (Staszewski et al., 1998). Eine Viruslast oberhalb der Nachweisgrenze nach sechs Monaten (Gray et al., 1998) ist als Versagen zu werten. Das gleiche gilt für eine wieder ansteigende Viruslast. Somit ist der Abfall der Viruslast der schnellste Parameter, der zur Beurteilung eines Therapieansprechens herangezogen werden kann.

5.4.1.2.2 Immunologischer Therapieerfolg

Dem virologischen Erfolg folgt mit oft leichter zeitlicher Verzögerung der immunologische Therapieerfolg (Chun et al., 2002). Darunter wird ein Anstieg der CD4-Zellen verstanden. Genauer definiert ist dieser immunologische Therapieerfolg allerdings nicht. Je nach Studie werden Anstiege um 50, 100 oder 200 CD4-Zellen/ μ l oder Anstiege auf über 200 oder über 500 CD4-Zellen/ μ l als Erfolg gewertet. Als Versagen wird dabei meist ein fehlender Anstieg oder ein Absinken der CD4-Zellen unter HAART bezeichnet. Individuell ist der CD4-Anstieg unter HAART nur schlecht vorauszusagen; er kann extrem variieren. Wie der Abfall der Viruslast verläuft der Anstieg der CD4-Zellen biphasisch. Nach einem ersten, oft raschen Anstieg in den ersten drei bis vier Monaten verlangsamt sich die Geschwindigkeit anschließend merklich - in einer prospektiven Studie von fast 1.000 Patienten stiegen die CD4-Zellen in den ersten drei Monaten im Median monatlich um 21,2 CD4-Zellen/ μ l, in den folgenden Monaten nur noch um 5,5 CD4-Zellen/ μ l (Le Moing et al., 2002).

Im Gegensatz zum virologischen Therapieerfolg in Form der HIV-1 Viruslast Messung ist also die CD4-Zellzahl ein langfristiger Parameter. In Hinblick auf unsere Studie korreliert dieser - langfristig gesehen - genauere Parameter für den Zustand des Immunsystems und des Ansprechens auf eine HAART Therapie daher eher mit der HHV-8 Viruslast.

5.4.1.2.3 Klinischer Therapieerfolg

Zum Zeitrahmen, ab wann die Wirksamkeit einer HAART klinisch gesichert ist, gibt es keine einheitliche Regelung. Im Gegensatz zur Therapiedauer von 12 Wochen in unserem Falle (in Anlehnung an Polis et al., 2001) wurde im Rahmen der spanischen SCAN-Studie bei 67 Patienten mit früher HIV-Infektion (CD4-Zellen >500/ μ l, Viruslast >5000 Kopien/ml) ein Zeitfenster von 24 Wochen gewählt. Nach dieser Zeit war die Viruslast bei 90% bzw. 100% der Patienten unter 200 Kopien/ml gesunken, die CD4-Zellzahl um 102 bzw. 148 Zellen/ μ l gestiegen (Garcia et al., SCAN Studie 1999). Die minimale Therapiedauer von 12 Wochen in unserem Fall könnte somit als zu kurz gewählt sein, sprich die Auswirkungen einer HAART Therapie auf die HHV-8 Viruslast könnten bei einer anderen Einteilung der zwei (HA)ART-Gruppen (Grenze: Mindesteinnahmezeit der (HA)ART Therapie 6 Monate) noch deutlicher gewesen sein.

Im Vergleich mit Daten von vor 1997, also vor Einführung der HAART Therapie, war die Letalität durch HIV-1-Infektionen 1997 um 50 Prozent und 2001 um über 80 Prozent reduziert; während dieser Zeit erhöhte sich die Nutzung der HAART Therapie von 22 Prozent 1997 auf 57 Prozent 2001 (Porter et al., 2003). Die stärkste Reduktion der Sterblichkeitsrate konnte kurz nach Einführung der HAART Therapie 1997 verzeichnet werden.

Im Gegensatz zur Zeit vor der Einführung der HAART Therapie hatten i.v.-drogenabhängige Patienten 1999 bis 2001 viermal höhere Todesraten als Personen, die durch homosexuellen Kontakt infiziert worden waren. Vor 1997 lag das Risiko einer AIDS-Erkrankung bei Personen, die bei Serokonversion über 45 Jahre oder älter waren, höher als bei Personen zwischen 16 und 24 Jahren. Zwischen 1999 und 2001 jedoch gab es wenig Hinweise auf ein unterschiedliches Risiko aufgrund des Alters.

5.4.2 Einfluss der (HA)ART Therapie auf die KS Inzidenz

HAART allein kann zu einem Verschwinden von klinisch manifesten Kaposi-Sarkomen führen. Dies ist am ehesten durch einen indirekten Effekt erklärbar: durch eine Verbesserung des Immunsystems unter einer effektiven anti-retroviralen Therapie (De Milito et al., 1999). Aboulafia beschrieb 1998 den Fall eines HIV-1-positiven Patienten im AIDS-Stadium, der bei einer CD4-Zellzahl von 35/ μ l und hoher HIV-1 Viruslast ein pulmonales KS entwickelte (Aboulafia, 1998). Unter einer begonnenen HAART Therapie stieg seine CD4-Zellzahl, die HIV-1 Viruslast sank unter die Nachweisgrenze und das pulmonale KS bildete sich zurück. Demzufolge scheint eine effektive HAART Therapie die Inzidenz von KS zu reduzieren.

Die klinische Besserung von KS hat mehrere Ursachen:

Bei AIDS-Patienten, die an einem KS litten, wurde beobachtet, dass die zelluläre Abwehr durch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) im Vergleich zu gesunden Probanden deutlich reduziert ist und sich unter HAART wieder erholt (Sirianni et al. 2002). Da sich zugleich gezeigt hat, dass NK-Zellen HHV-8 infizierte Zellen lysieren, liegt die Folgerung nahe, dass eine durch HAART wieder erholte NK-Zell-Abwehr HHV-8 besser kontrollieren kann.

Renwick postulierte, dass das Risiko, an einem KS zu erkranken, höher ist, wenn sich ein Patient zunächst mit HIV-1 und erst anschließend mit HHV-8 infiziert (Renwick et al., 1998). *In vitro* wurde beobachtet, dass Tat das Wachstum von KS-Spindelzellen durch direkte Bindung an einen Rezeptor für VEGF induziert und zugleich die durch Chemotherapeutika induzierte Zellapoptose HHV-8 infizierter Zellen verhindert (Albini et al., 1996; Deregibus et al., 2002). HAART unterdrückt also die Produktion von Tat und bewirkt über diesen Weg eine deutlich verminderte KS-Entwicklung unter HAART.

In einigen Fallbeschreibungen wurde postuliert, dass durch Gabe von Proteaseinhibitoren sich ein bestehendes KS zurückbilden und auch die HHV-8 Viruslast reduziert werden kann. Die Rückbildung von KS erfolgt, indem Proteaseinhibitoren wie z.B. Saquinavir das Wachstum und die Invasion von Spindelzellen blockieren (Sgadari et al., 2002). Dabei ist jedoch noch unklar, ob dies direkt oder aber indirekt über die Wirkung auf HIV-1 erfolgt.

Eine Bestätigung dieser Beobachtungen konnte in unserer Studie nicht erfolgen. Ein Grund hierfür liegt sicher darin, dass in unserem Patientenkollektiv nicht zwischen HAART Therapieversagern und HAART Respondern unterschieden wurde. Hätten wir nur Patienten untersucht, bei denen die HAART Therapie erfolgreich angewandt wurde, wären wir möglicherweise zu einem anderen Ergebnis gekommen. Pellet und Mitarbeiter beschrieben in einer retrospektiven Studie, dass die Zeit zwischen dem vorbestehendem klinisch manifestem KS und der kompletten Rückbildung der Läsionen bei Patienten unter HAART im Mittel 251 Tage betrug (Pellet et al., 2001). Die Dauer bis zur Rückbildung war bei Patienten, die bis dahin nicht mit HAART therapiert worden waren, am kürzesten. Also spielt auch der Zeitpunkt der Manifestation des KS und des Therapiebeginns eine mögliche Rolle bei der Effektivität einer HAART Therapie.

5.4.3 Einfluss der (HA)ART Therapie auf die HHV-8 Viruslast

In unseren Untersuchungen stellte sich heraus, dass die Einnahme anti-retroviral wirksamer Medikamente keine direkte Wirkung auf die HHV-8 Viruslast hat. Dem widersprechend berichteten Gill und Mitarbeiter darüber, dass von 20 untersuchten HIV-1 und HHV-8 positiven Patienten (d.h. mit jeweils nachweisbarer Viruslast) bei 12 Patienten (d.h. 60%) nach regelmäßiger Einnahme von HAART kein HHV-8 mehr nachweisbar war (Gill et al. 2002). Dabei konnten sie interessanterweise keinen Unterschied zwischen HAART mit Proteaseinhibitoren und HAART mit nicht-nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTI) bezüglich der Wirkung auf die HHV-8 Viruslast feststellen.

In unserer Studie jedoch konnten wir zeigen, dass die CD4-Zellzahl und damit der Grad der Immunsuppression mit der HHV-8 Viruslast korreliert. Da das Ansprechen einer HAART Therapie neben der HIV-1 Viruslast auch an der Höhe der CD4-Zellzahl abgeschätzt werden kann, gilt demnach, dass bei einer wirksamen (HA)ART Therapie die HHV-8 Viruslast signifikant niedriger ist und somit (HA)ART indirekt doch eine Wirkung auf die Viruslast von HHV-8 hat. Diese Annahme wurde durch eine von Wilkinson und Mitarbeitern durchgeführte Untersuchung unterstrichen: Bei HHV-8 und gleichzeitig HIV-positiven Patienten wurde unter einer einjährigen HAART Therapie beobachtet, dass durch den dadurch bedingten Anstieg der CD8- und CD4-Zellzahl die HHV-8 Viruslast signifikant gesenkt werden konnte (Wilkinson et al., 2002).

In anderen Studien konnte hingegen kein Zusammenhang zwischen dem Nachweis von HHV-8 in PBMC und der CD4-Zellzahl gezeigt werden (Humphrey et al, 1996). Im Gegensatz zu unserer Studie wurde hier jedoch nur eine qualitative PCR durchgeführt. Daher konnte keine Korrelation zwischen der HHV-8 Viruslast und der CD4-Zellzahl untersucht werden.

Neben der CD4-Zellzahl gibt es noch weitere Parameter, die einen Einfluss auf die HHV-8 Viruslast haben können. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) bei gesunden Menschen lysieren HHV-8 infizierte Zellen (Sirianni et al., 2002). Bei Patienten im AIDS-Stadium sind hingegen auch die NK-Zellen in Mitleidenschaft gezogen und somit reduziert (Sirianni et al., 2002). AIDS-Patienten mit progressivem Kaposi-Sarkom haben eine signifikant schwächere NK-Zellvermittelte Immunabwehr im Vergleich zu Gesunden, die sich unter einer HAART Therapie jedoch wieder erholen kann und die eine Besserung des KS mit sich bringt (Sirianni et. al, 2002). Da wir nur Serumproben und keine zellulären Patientenproben zur Verfügung hatten, konnte die Aktivität der NK-Zellen leider nicht getestet werden.

5.5 Einfluss von Herpesvirus Therapeutika auf die HHV-8 Infektion

5.5.1 Einfluss von Herpesvirus Therapeutika auf die KS Inzidenz

Wie bereits erwähnt, hatte in unserer Studie keines der virostatisch wirksamen Medikamente einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung eines KS. Sicherlich sollte man bei diesem Ergebnis nicht außer Acht lassen, dass Patienten, die Foscarnet erhalten, äußerst immunsupprimiert sind und aufgrund dieser massiven Immunsuppression eher an einem KS erkranken. Zudem gilt zu beachten, dass die Gruppe der Foscarnet-therapierten Patienten äußerst klein war und somit statistische Aussagen generell schwierig sind. Man kann aber sicherlich in unserem Kollektiv sagen, dass Foscarnet die Inzidenz von KS nicht herabsetzt.

Interessanterweise zeigte sich in einigen retrospektiven klinischen Studien, dass Foscarnet - meist als Mittel gegen schwere CMV-Infektionen eingesetzt - am ehesten das Auftreten von KS verhindert, gefolgt von Ganciclovir. Aciclovir zeigte auch hierbei keinen Effekt (Robles et al., 1999; Glesby et al., 1996). In einer retrospektiven Studie von Jones, bei der HIV-positive Patienten, die bisher kein Kaposi-Sarkom hatten, senkte nur Foscarnet signifikant das Risiko, an einem Kaposi-Sarkom zu erkranken (Jones et al., 1995). Als mögliche Ursache hierfür wird die unterschiedliche Wirkungsweise von Foscarnet im Vergleich zu Ganciclovir und Aciclovir diskutiert. Foscarnet benötigt im Gegensatz zu Aciclovir und Ganciclovir keine Phosphorylierung durch virale Kinasen, sondern inhibiert direkt die virale DNA-Replikation der Herpesviren.

Das virostatisch wirksame Foscarnet kann also das Risiko, an einem KS zu erkranken, senken, indem es die Virusreplikation hemmt, es hat jedoch bei schon bestehendem KS keine Anti-Tumor-Wirkung (Little et al., 2003). Ein möglicher Grund liegt wahrscheinlich darin, dass die meisten Zellen des KS sich in der latenten Phase befinden, nur 1-3% sind in der lytischen Phase (Staskus et al., 1997). Somit sollte eine antivirale Therapie beim schon bestehenden KS in vivo unwirksam sein. Zudem wurde postuliert, dass HHV-8 ein notwendiger aber nicht hinreichender Faktor zur Entstehung von KS sei, doch sobald sich der Tumor entwickelt hat, ist die virale Replikation nicht mehr am Fortschreiten der Erkrankung beteiligt (Aoki et al., 2003). Außerdem zeigte sich, dass auch Hypoxie auf das Fortschreiten eines KS wirkt: Hypoxie erhöht die lytische Replikationsrate von HHV-8 (Davis et al., 2001). Dies könnte erklären, weshalb KS besonders häufig an den unteren Extremitäten vorkommen; die unteren Extremitäten sind am ehesten hypoperfundiert (Davis et al., 2001).

5.5.2 Einfluss von Herpesvirus Therapeutika auf die HHV-8 Viruslast

Keines der in der Literatur als möglicherweise gegen HHV-8 wirksam genannte Medikament hatte in unserer Studie einen Einfluss auf die HHV-8 Viruslast. Das *in vitro* wirksame Foscarnet konnte aufgrund einer zu niedrigen Fallzahl in unserer Studie nicht ausreichend beurteilt werden.

In einer *in vitro* Studie mit Primären Effusionslymphom Zelllinien, die durch TPA in die lytische Phase des Zellzyklus und somit zur Virusfreisetzung angeregt wurden, erfolgte eine Testung vier verschiedener, gegen Herpesviren wirksamer Medikamente: Cidofovir, Aciclovir, Ganciclovir und Foscarnet (Kedes, 1997). Hierbei zeigte sich, dass die HHV-8 Replikation durch Ganciclovir, Foscarnet und Cidofovir, jedoch nicht durch Aciclovir inhibiert werden kann.

5.6 Weitere Therapiemöglichkeiten des KS

In einer Studie von Fife und Mitarbeitern wurde eine weitere Therapieoption des KS beschrieben: Dabei stellte man eine gewisse Wirksamkeit von Thalidomid bei kutanem Kaposi-Sarkom HIV-positiver Männer fest (Fife et al., 1998). Neben einem partiellen klinischen Ansprechen kam es unter Thalidomidtherapie auch zu einer HHV-8 DNA Viruslastabnahme. D'Amato und Mitarbeiter konnten zeigen, dass ein Metabolit des Thalidomids die Angiogenese, vermittelt über den basic fibroblast growth factor (BFGF), hemmt (D'Amato et al., 1994). BFGF ist neben VEGF ein wichtiger Proliferationsfaktor für die Spindelzellen im KS.

Weitere mehr oder weniger erfolgreiche Therapieversuche von KS bestanden bei lokalem Befall in einer Bestrahlungstherapie, topischer Applikation von ATRA (all-trans retinoic acid), Kryotherapie oder Lasertherapie (Dezube, 2000). Bei systemischem kutanem Befall zeigten Interferon α -2a oder Interferon α -2b bei klassischem KS (d.h. HIV-negativem) nach 4 Wochen Therapie eine komplette Rückbildung, wobei interessanterweise in den Hautbereichen, in denen das KS sich manifestierte, HHV-8 trotz kompletter klinischer Remission noch nachweisbar war (Perez et al., 1998; Pfrommer et al., 1998). Möglicherweise handelte es sich hierbei um Viren, die sich in der latenten Phase befanden und onkogene Kofaktoren wie vIL-6 produzierten.

Bei ausgeprägtem viszeralen Befall zeigten auch zytostatische Therapeutika wie pegyliertes Doxorubicin, Paclitaxel oder eine Kombination aus Doxorubicin, Bleomycin und Vincristin Erfolge (Northfeldt et al., 1998). Hierbei setzt sich das pegylierte Doxorubicin immer mehr als Mittel der ersten Wahl durch. Aufgrund der guten Verträglichkeit und gleichen Wirksamkeit ist es den Kombinationstherapien überlegen und gilt somit inzwischen als first-line Therapie (Sharpe et al., 2002). Paclitaxel wird meist bei Anthracyclin-refraktären KS eingesetzt (Cattelan et al., 2002).

Eine bisher nur am Tiermodell erprobte Hemmung des VEGF mittels monoklonalen Antikörpern scheint sehr erfolgsversprechend zu sein (Aoki et al., 1999).

Eine weitere nur *in vitro* beschriebene Therapiemöglichkeit stellt der Einsatz Calcineurin-hemmender Substanzen wie Cyclosporin oder Tacrolimus dar. Calcineurin ist ein intrazellulärer Transmitter, der durch Freisetzung intrazellulären Calciums die Replikation von HHV-8 in latent infizierten Zellen anregt (Zoetewij et al., 2001). Aufgrund der bekannten erheblichen Nebenwirkungen und einer zusätzlichen, unerwünschten Immunsuppression ist ein klinischer Einsatz bisher jedoch nicht möglich.

Als weitere Therapieoption steht eine bisher ebenfalls nur *in vitro* durchgeführte Radioimmuntherapie zur Verfügung. Klinische Studien stehen jedoch hierfür noch aus (Leigh et al., 1999).

Curreli und Mitarbeiter stellten fest, dass Glycyrrhizinsäure die latente HHV-8 Infektion von B-Lymphozyten stoppt, indem sie die Expression eines multifunktionellen Proteins von HHV-8, des latency-associated nuclear antigen (LANA) vermindert und dadurch p53 reaktiviert, wodurch es zum Zelltod der infizierten Zelle kommt (Curreli et al., 2005).

All diese Therapieoptionen wurden bei den Patienten in unserer Studie nicht verwendet.

5.7 Ausblick

Eine Unterteilung der Patientengruppen nach Infektionsweg für HIV-1 wäre in unserer Studie hinsichtlich der HHV-8 Viruslast interessant, da man festgestellt hat, dass bei i.v.-Drogenabhängigen die Inzidenz von KS im Vergleich zu Homosexuellen viel niedriger ist (Selik et al. 1987). Leider waren diese Daten jedoch für uns nicht zugänglich. In einer Amsterdamer Kohorte wurden 1167 i.v.-Drogenabhängige und 1459 homosexuelle Männer auf HHV-8 Antikörper untersucht (Goudsmit et al., 2000). Bei 31 i.v.-Drogenabhängigen und 215 homosexuellen Männern wurde der Test zwischen 1983 und 1996 positiv. Risikofaktoren für die Serokonversion waren eine HIV-Infektion sowie eine hohe Anzahl von Partnern, mit denen oraler Geschlechtsverkehr praktiziert wurde. Analverkehr sowie anal-oraler Geschlechtsverkehr waren keine Prädiktoren. Die Seroprävalenz bei heterosexuellen i.v.-Drogenabhängigen entspricht der der Normalbevölkerung, wodurch eine parenterale Übertragungsweise eher unwahrscheinlich erscheint.

Auch Parameter wie Alter, Geschlecht oder Herkunft wurden nicht berücksichtigt, könnten aber weitere epidemiologische Erkenntnisse ergeben.

Die PCR aus PBMC sollte nicht zum Screening auf HHV-8 eingesetzt werden (Martin, 2003). Wie bereits erwähnt, war selbst bei KS-Patienten im peripheren Blut nur in 20 bis 60% (in einigen Studien bis 90%) HHV-8 nachweisbar. Die quantitative PCR sollte vielmehr dem Staging und der Verlaufsbeobachtung einer bereits bekannten HHV-8 Infektion mit klinischer Manifestation dienen. Hierbei sollte jedoch zwischen KS und anderen mit HHV-8 assoziierten Erkrankungen unterschieden werden. Die intrazelluläre HHV-8 Viruslast variiert stark und beträgt bei PEL und MCD bis zu 80 Kopien pro Lymphozelle (Cesarman et al., 1999). Bei PEL und beim MCD ist die HHV-8 Viruslast ein guter Indikator für die Krankheitsaktivität. Wahrscheinlich ist es sinnvoll, die HHV-8 Viruslast als Therapieindikator einzusetzen und bei Persistenz der HHV-8 Viruslast eine Therapieumstellung in Betracht zu ziehen.

Als weitere mögliche Verlaufparameter könnte die Expression bestimmter viraler Proteine dienen. Bei der Sequenzierung des HHV-8 Genoms wurden, wie bereits erwähnt, mehrere Gene entdeckt, die eine Rolle bei der malignen Transformation spielen. Hierzu gehören unter anderem v-Cyclin, ein virales Cyclin Homolog, und ein Interleukin-6-homologes Protein, die beide VEGF, einen Wachstumsfaktor für endotheliale Zellen und Gefäße, stimulieren (Cathomas, 2003).

Als Screening-Untersuchung ohne klinische Symptomatik sollten serologische Untersuchungen hingegen aufgrund der einfacheren und billigeren Handhabung bevorzugt werden.

6 Zusammenfassung

In der hier vorgelegten Arbeit wurden 234 Blutproben von insgesamt 121 HIV-infizierten Patienten auf HHV-8 untersucht. Mit Hilfe der Real-time TaqMan[®] PCR wurde HHV-8 quantitativ bestimmt. Insgesamt konnte in 132 Proben HHV-8 nachgewiesen werden, wobei die HHV-8 Viruslast zwischen $1 \text{ Geq}/1 \times 10^4$ Zellen und $457.079 \text{ Geq}/1 \times 10^4$ Zellen betrug. Der höchste Wert wurde bei einem Patienten gemessen, der an der multizentrischen Castlemanschen Erkrankung litt.

Zudem wurde untersucht, ob sich bestimmte Einflussfaktoren wie die CD4-Zellzahl, die HIV-1 Viruslast, die Einnahme einer anti-retroviralen (HAART) oder virostatischen (Aciclovir, Ganciclovir oder Foscarnet) Therapie auf die HHV-8 Viruslast auswirken.

Da im Rahmen einer erfolgreichen HAART Therapie die CD4-Zellzahl mittelfristig ansteigt, konnten wir einen indirekten Einfluss der HAART Therapie auf die HHV-8 Viruslast nachweisen: Bei den HHV-8 positiven Patienten stellten wir fest, dass die CD4-Zellzahl negativ mit der HHV-8 Viruslast korreliert, d.h. je höher die CD4-Zellzahl und somit je besser die Immunabwehr, desto niedriger war die gemessene HHV-8 Viruslast.

Die virostatischen Medikamente Aciclovir, Ganciclovir und Foscarnet hatten *in vivo* keine signifikante Wirkung auf die HHV-8 Viruslast, wobei Foscarnet aufgrund einer zu niedrigen Fallzahl der damit therapierten Patienten nicht ausreichend beurteilt werden konnte.

Zusammenfassend kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die quantitative HHV-8 PCR dem Staging und der Verlaufsbeobachtung einer bereits bekannten HHV-8 Infektion mit klinischer Manifestation dienen kann.

7 Literaturverzeichnis

- Aboulafia D. M.: "Regression of acquired immunodeficiency syndrome related pulmonary Kaposi's sarcoma after highly active antiretroviral therapy." *Mayo clinic proceedings* 73 (1998): 439-443.
- Albini A., Soldi R., Giunciuglio D., Giraude E., Benelli R., Primo L.: "The angiogenesis induced by HIV-1 tat protein is mediated by the Flk-1/KDR receptor on vascular endothelial cells." *Nature Medicine* 2 (1996): 1371-1375.
- Aoki Y., Tosato G.: "Role of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in the pathogenesis of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus." *Blood* 94 (1999): 4247-4254.
- Aoki Y., Tosato G.: "Pathogenesis and Manifestations of Human Herpesvirus-8-associated Disorders." *Seminars in Hematology* 40 (2003): 143-153.
- Ariyoshi K., Schim van der Koeff M., Cook P., Whitby D., Corrah T., Jaffar S., Cham F., Sabally S., O'Donovan D., Weiss R. A., Schulz T. F., Whittle H.: "Kaposi's sarcoma in Gambia, West Africa, is less frequent in human immunodeficiency virus type 2 than in human immunodeficiency virus type 1 infection despite a high prevalence of human herpesvirus 8." *Journal of Human Virology* 1 (1998): 193-199.
- Bartlett J. G.: "Zidovudine now or later?". *The New England journal of medicine* 329 (1993): 351-352.
- Beral V.: "Epidemiology of Kaposi's sarcoma." *Cancer, HIV and AIDS. Vol. 10* (1991): 5-22.
- Bigoni B., Dolcetti R., de Lellis L.: "Human herpesvirus 8 is present in the lymphoid system of healthy persons and can reactivate in the course of AIDS." *Journal of Infectious Disease* 173 (1996): 542-549.
- Binley J. M., Schiller D. S., Ortiz G. M., Hurley A., Nixon D. F., Markowitz M. M., Moore J. P.: "The Relationship between T-Cell Proliferative Responses and Plasma Viremia during Treatment of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection with Combination Antiretroviral Therapy." *The Journal of Infectious Diseases* 181 (2000): 1249-1263.
- Boeckh M., Boivin G.: "Quantitation of Cytomegalovirus: Methodologic Aspects and Clinical Applications." *Clinical Microbiology Reviews* 11 (1998): 533-554.

- Boshoff C., Weiss R.: "AIDS-related malignancies." *National Review of Cancer* 2 (2002): 373–382.
- Boshoff C, Schulz T. F., Kennedy M. M., Graham A. K., Fisher C., Thomas A., McGee J. O., Weiss R. A., O'Leary J. J.: "Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infects endothelial and spindle cells." *Nature Medicine* 1 (1995): 1274-1278.
- Bourbouliou D., Whitby D., Boshoff C.: "Serologic evidence for mother-to-child transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection." *Journal of the American Medical Association* 280 (1998): 31-32.
- Bower M., Fox P., Fife K., Gill J., Nelson M., Gazzard B.: "Highly active anti-retroviral therapy (HAART) prolongs time to treatment failure in Kaposi's sarcoma." *AIDS* 13 (1999): 2105-2111.
- Brockmeyer N. H., Klouche M., Stücker M., Altmeyer P., Kreuter A.: "Kaposi-Sarkom - ein Update." *Haut* 15 (2004): 144-151.
- Campbell T. B., Borok M., Gwanzura L., MacWhinney S., White I. E., Ndemera B., Gudza I., Fitzpatrick L., Schooley R. T.: "Relationship of human herpesvirus 8 peripheral blood virus load and Kaposi's sarcoma clinical stage." *AIDS* 14 (2000): 2109-2116.
- Cathomas G.: "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)/human herpesvirus 8 (HHV-8) as a tumour virus." *Herpes* 10 (2003): 72-77.
- Cattelan A. M., Trevenzoli M., Aversa S. M.: "Recent advances in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma." *American Journal of Clinical Dermatology* 3 (2002): 451-462.
- Centers for Disease Control and Prevention. "HIV/AIDS Surveillance Report." 12 (2000): 1-44.
- Cesarman E., Knowles D. M.: "The role of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus in lymphoproliferative diseases." *Seminars in Cancer Biology* 9 (1999): 165-174.
- Chang T. J., Juan C. C., Yin P. H., Chi C. W., Tsay H. J.: "Up-regulation of beta-actin, cyclophilin and GAPDH in N1S1 rat hepatoma." *Oncology reports* 5 (1998): 469-471.
- Chang Y., Cesarman E., Pessin M. S., Lee F., Culpepper J., Knowles D. M., Moore P.S.: "Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma." *Science* 266 (1994): 1859-1865.
- Chang Y., Ziegler J., Wabenga H.: "Kaposi's sarcoma associated herpesvirus and Kaposi's sarcoma in Africa: Uganda Kaposi's sarcoma study group." *Arch of internal Medicine* 156 (1996): 202-204.

- Chen F. H., Samson K. T., Chen H., Pan S. N., He Z. X., Ikura Y., Shioda S.: "Clinical applications of real-time PCR for diagnosis and treatment of human cytomegalovirus infection in children." *Pediatric Allergy and Immunology* 15 (2004): 210-215.
- Chun T. - W., Justement J. S., Pandya P., Hallahan C. W., McLaughlin M., Liu S., Ehler L. A., Kovacs C., Fauci A. S.: "Relationship between the Size of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Reservoir in Peripheral Blood CD4⁺ T Cells and CD4⁺ : CD8⁺ T Cell Ratios in Aviremic HIV-1 Infected Individuals Receiving Long-Term Highly Active Antiretroviral Therapy." *The Journal of Infectious Diseases* 185 (2002): 1672-1676.
- Concorde Coordinating Committee: "Concorde: MRC/ANRS randomised double-blind controlled trial of immediate and deferred zidovudine in symptom-free HIV infection." *Lancet* 343 (1994): 871-881.
- Crumpacker C. S.: "Mechanism of action of foscarnet against viral polymerases." *The American journal of medicine* 92 (1992): 3-7.
- Curreli F., Friedman-Kien A. E., Flore O.: "Glycyrrhizic acid alters Kaposi sarcoma-associated herpesvirus latency, triggering p53-mediated apoptosis in transformed B lymphocytes." *The Journal of Clinical Investigation*. 115 (2005): 642-652.
- D'Amato R., Loughnan M. S., Flynn E.: "Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis." *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America* 91 (1994): 4082-4085.
- Davis D. A., Rinderknecht A. S., Zoetewij J. P.: "Hypoxia induces lytic replication of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus." *Blood* 97 (2001): 3244-3250.
- de Leeuw W. J., Slagboom P. E., Vijg J.: "Quantitative comparison of mRNA levels in mammalian tissues: 28S ribosomal RNA level as an accurate internal control." *Nucleic acids research* 17 (1989): 10137-10138.
- De Milito A., Catucci M., Ventruri G., Romano L., In Candela L., Valensin P. E., Zazzi M.: "Antiretroviral therapy with protease inhibitors in human immunodeficiency virus type 1 and human herpesvirus 8-coinfected patients." *Journal of medical virology* 57 (1999): 140-144.
- Decker L. L., Shankar P., Khan G., Freeman R. B., Dezube B. J., Lieberman J., Thorley-Lawson D. A.: "The Kaposi Sarcoma-associated Herpesvirus (KSHV) is present as an intact latent Genome in KS tissue but replicates in the peripheral blood mononuclear cells of KS patients." *Journal of experimental Medicine* 184 (1996): 283-288.

- Deregibus M. C., Cantaluppi V., Doublier S., Brizzi M. F., Deambrosis I., Albini A.: "HIV-1-Tat protein activates phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-dependent survival pathways in Kaposi's sarcoma cells." *Journal of Biological Chemistry* 277 (2002): 25195-25202.
- Dezube B. J.: "Acquired immunodeficiency syndrome-related Kaposi's sarcoma: clinical features, staging, and treatment." *Seminars of Oncology* 27 (2000): 424-430.
- Direkze S., Laman H.: "Regulation of growth signalling and cell cycle by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genes." *International Journal of Experimental Pathology* 85 (2004): 305-319.
- Diociaiuti A., Nanni G., Cattani P.: "HHV8 in renal transplant recipients." *Transplant International* 13 (2000): 410-412.
- Dupin N., Grandadam M., Calvez V.: "Herpesvirus-like DNA sequences in patients with Mediterranean Kaposi's sarcoma." *Lancet* 345 (1995): 761-762.
- Endo T., Miura T., Koibuchi T., Nakamura H., Takahashi T., Odawara T., Goto M., Ajisawa A., Iwamoto A., Nakamura T.: "Molecular Analysis of Human Herpesvirus 8 by Using Single Nucleotide Polymorphisms in Open Reading Frame 26." *Journal of Clinical Microbiology* 41 (2003): 2492-2497.
- Fife K., Howard M. R., Gracie F., Phillips R. H., Bower M.: "Activity of thalidomide in AIDS-related Kaposi's sarcoma and correlation with HHV8 titre." *International journal of STD and AIDS* 9 (1998): 751-755.
- Gill J., Bourbouli D., Wilkinson J., Hayes P., Cope A., Marcelin A. G.: "Prospective study of the effects of antiretroviral therapy on Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection in patients with and without Kaposi sarcoma." *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 31 (2002): 384-390.
- Gilliland G., Perrin S., Blanchard K., Bunn H. F.: "Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (1990): 2725-2729.
- Glesby M. J., Hoover D. R., Weng S., Graham N. M. H., Phair J. P., Detels R., Ho M., Saah A. J.: "Use of antiviral agents decrease the occurrence of Kaposi's sarcoma: data from the Multicenter AIDS Cohort Study." *The Journal of infectious diseases* 173 (1996): 1477-1480.

- Goidin D., Mamessier A., Staquet M. - J., Schmitt D., Berthier-Vergnes O.: "Ribosomal 18S RNA Prevails over Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase and b-Actin Genes as Internal Standard for Quantitative Comparison of mRNA Levels in Invasive and Noninvasive Human Melanoma Cell Subpopulations." *Analytical Biochemistry* 295 (2001): 17-21.
- Goudsmit J., Renwick N., Dukers N.: "Human herpesvirus 8 infections in the Amsterdam cohort studies (1984-1997): analysis of seroconversion to ORF65 and ORF73." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (2000): 4838-4843.
- Gray C. M., Schapiro J. M., Winters M. A., Merigan T. C.: "Changes in CD4+ and CD8+ T cell subsets in response to highly active antiretroviral therapy in HIV type 1-infected patients with prior protease inhibitor experience." *AIDS research and human retroviruses* 14 (1998): 561-569.
- Haas J.: "Castlemansche Erkrankung." *Der bayerische Internist* 17 (1997): 373-377.
- Handbuch für QIAamp DNA Mini Kits und QIAamp DNA Blood Mini Kits 10/2002.
- Harrington W. J., Bagasra O., Sosa C. E., Bobroski L. E., Baum M., Wen X. L., Cabral I., Byrne G. E., Pomerantz R. J., Wood C.: "Human herpesvirus Type 8 DNA sequences in Cell-Free Plasma and Mononuclear Cells of Kaposi's Sarcoma Patients." *The Journal of Infectious Diseases* 174 (1996): 1101-1105.
- Higuchi R., Dollinger G., Walsh P. S., Griffith R.: "Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences." *Biotechnology* 10 (1992): 413-417.
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R.: "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions." *Biotechnology* 11 (1993): 1026-1030.
- Holden C. A.: "Histogenesis of Kaposi's sarcoma and angiosarcoma of the face and the scalp." *Journal of Investigative Dermatology* 93 (1989): 119S-124S.
- Huang L. - M., Chao M. - F., Chen M. - Y., Shih H., Chiang Y. - P., Chuang C. - Y., Lee C. - Y.: "Reciprocal regulatory interaction between Human Herpesvirus 8 and Human Immunodeficiency Virus Type 1." *Journal of biological chemistry* 276 (2001): 13427-13432.

- Humphrey R. W., O'Brien T. R., Newcomb F. M., Nishihara H., Wyvill K. M., Ramos G. A., Saville W., Goedert J. J., Straus S. E., Yarchoan R.: "Kaposi's sarcoma associated Herpesvirus-like DNA sequences in peripheral blood mononuclear cells: Association with KS and persistence in patients receiving anti-herpesvirus drugs." *Blood* 88 (1996): 297-301.
- IARC Working Group: "Kaposi's Sarcoma herpesvirus / human herpes virus 8." IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans 70 (1997): 375-392.
- Imami N., Antonopoulos C., Hardy G. A., Gazzard B., Gotch F. M.: "Assessment of type 1 and type 2 cytokines in HIV type 1-infected individuals: impact of highly active antiretroviral therapy." *AIDS research and human retroviruses* 15 (1999): 1499-1508.
- Jacobson L. P., Jenkins F. J., Springer G.: "Interaction of HIV-1 and HHV-8 infections on the incidence of Kaposi's sarcoma." *Journal of infectious diseases* 181 (2000): 1940-1949.
- Jaschke A., Mi H., Tropschug M.: "Human T cell cyclophilin 18 binds to thiol-specific antioxidant protein Aop1 and stimulates its activity." *Journal of molecular biology* 277 (1998): 763-769.
- Jenner R. G., Maillard K., Cattini N., Weiss R. A., Boshoff C., Wooster R, Kellam P.: "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-infected primary effusion lymphoma has a plasma cell gene expression profile." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (2003): 10399-10404.
- Jones J., Hanson D., Chu S., Ward J., Jaffe H.: "AIDS-associated Kaposi's sarcoma." *Science* 267 (1995): 1078-1079.
- Katano H., Sato Y., Kurata T., Mori S., Sata T.: "Expression and localization of human herpesvirus 8-encoded proteins in primary effusion lymphoma, Kaposi's sarcoma, and multicentric Castlemans disease." *Virology* 269 (2000): 335-344.
- Kedes D. H., Ganem D.: "Sensitivity of Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus Replication to Antiviral drugs-Implications for potential therapy." *The Journal of clinical investigation* 99 (1997): 2082-2086.
- Kempf D. J., Rode R. A., Xu Y., Sun E., Heath-Chiozzi M. E., Valdes J., Japour A. J., Danner S., Boucher C., Molla A., Leonard J. M.: "The duration of viral suppression during protease inhibitor therapy for HIV-1 infection is predicted by plasma HIV-1 RNA at the nadir." *AIDS* 12 (1998): 9-14.
- Kennedy M. M., Lucas S. B., Russell-Jones R., Howells D. D., Picton S. J., Bardon A., Comley I. L., McGee J. O., O'Leary J. J.: "HHV-8 and female Kaposi's sarcoma." *Journal of Pathology* 183 (1997): 447-452.

- La Duca J. R., Love J. L., Abbott L. Z., Dube S., Freidman-Kien A. E., Poiesz B. J.: "Detection of human herpesvirus 8 DNA sequences in tissues and bodily fluids." *Journal of Infectious Diseases* 178 (1998): 1610-1615.
- Lallemand F., Desire N., Rozenbaum W., Nicolas J. C., Marechal V.: "Quantitative analysis of human herpesvirus 8 viral load using a real-time PCR assay." *Journal of Clinical Microbiology* 38 (2000): 1404-1408.
- Le Moing V., Thiebaut R., Chene G., Leport C., Cailleton V., Michelet C., Fleury H., Herson S., Raffi F.: "Predictors of long-term increase in CD4(+) cell counts in HIV-infected patients receiving a protease inhibitor-containing antiretroviral regimen." *Journal of infect diseases* 185 (2002): 471-480.
- Lebbe C., Blum L., Pellet C., Blanchard G., Verola O., Morel P.: "Clinical and biological impact of antiretroviral therapy with protease inhibitors on HIV-related Kaposi's sarcoma." *AIDS* 12 (1998): F45-F49.
- Ledergerber B., Egger M., Opravil M.: "Clinical progression and virological failure on HAART in HIV-1 patients: a prospective cohort study." *Lancet* 353 (1999): 863-868.
- Leigh B. R., Burke P. A., Hong A., O'Donnell R. T., Howell L.: "Preclinical evaluation of chimeric L6 antibody for the treatment of Kaposi's sarcoma with radioimmunotherapy." *Cancer Biotherapy and Radiopharmatherapeutics* 14 (1999): 113-120.
- Levine A. M., Tulpule A.: "Clinical aspects and management of AIDS-related Kaposi's sarcoma." *European Journal of Cancer* 37 (2001): 1288-1295.
- Li J. J., Huang Y. Q., Cockerell C. J.: "Localization of human herpes-like virus type 8 in vascular endothelial cells and perivascular spindle-shaped cells of Kaposi's sarcoma lesions by in situ hybridization." *American Journal of Pathology* 148 (1996): 1741-1748.
- Lin J. C., Wang W. Y., Chen K. Y., Wei Y. H., Liang W. M., Jan J. S., Jiang R. S.: "Quantification of plasma Epstein-Barr virus DNA in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma." *New England Journal of Medicine* 350 (2004): 2461-2470.
- Lietman P. S.: "Clinical pharmacology: Foscarnet." *American Journal of Medicine* (1992): 8S-11S.
- Little R. F., Merced-Galindez F., Staskus K.: "A pilot study of aciclovir in patients with Kaposi's sarcoma." *Journal of Infectious Diseases* 187 (2003): 147-153.
- Longo M. C., Berninger M. S., Hartey J. L.: "Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reaction." *Gene* 93 (1990): 125-128.

- Lottspeich F., Zorbass H. (1998): "Bioanalytik." Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Martin J. N.: "Diagnosis and Epidemiology of Human Herpesvirus 8 Infection." Seminar of Hematology 40 (2003): 133-142.
- Massarelli G., Scott C. A., Ibba M., Tanda F., Cossu A.: "Immunocytochemical profile of Kaposi's sarcoma cells: their reactivity to a panel of antibodies directed against different tissue cell markers." Applied Pathology 7 (1989): 34-41.
- Matthews T., Boehme R.: "Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir." Reviews of infect diseases 10 (1988): 490-494.
- Mayama S., Cuevas L. E., Sheldon J.: "Prevalence and transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in Ugandan children and adolescents." Internal Journal of Cancer 77 (1998): 817-820.
- Medveczky M. M., Horvath E. L., Medveczky P. G.: "In vitro antiviral drug sensitivity of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus." AIDS 11 (1997): 1327-1332.
- Morini M., Benelli R., Giunciuglio O., Carlone S., Arena G., Noonan D. M., Albini A.: "Kaposi's sarcoma cells of different etiologic origins respond to HIV-Tat through the Flk-1/KDR (VEGFR-2): relevance in AIDS-KS pathology." Biochemical and Biophysical Research Communications 273 (2000): 267-271.
- Mullis K. B., Faloona F. A.: "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods in enzymology 155 (1987): 335-350.
- Neipel F., Fleckenstein B.: "The role of HHV-8 in Kaposi's sarcoma." Cancer Biology 9 (1999): 151-164.
- Northfeldt D. W., Dezube B., Thommes J., Miller B., Fischl M., Friedman K., Kaplan L., Mond C., Mamelok R.: "Pegylated doxorubicin versus doxorubicin, bleomycin and vincristine in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma." Journal of clinical oncology 16 (1998): 2445-2451.
- Oikarinen A., Makela J., Vuorio T., Vuorio, E.: "Comparison on collagen gene expression in the developing chick embryo tendon and heart. Tissue and development time-dependent action of dexamethasone." Biochimica et biophysica acta 1089 (1991): 40-46.
- Oksenhendler E., Cazals-Hatem D., Schulz T. F.: "Transient angiolymphoid hyperplasia and Kaposi's sarcoma after primary infection with human herpesvirus 8 in a patient with human immunodeficiency virus infection." The New England journal of medicine 338 (1998): 1585-1590.

- O'Neill E., Douglas J. L., Chien M. L., Garcia J. V.: "Open reading frame 26 of human herpesvirus 8 encodes a tetradecanoyl phorbol acetate- and butyrate-inducible 32-kilodalton protein expressed in a body cavity-based lymphoma cell line." *Journal of Virology* 71 (1997): 4791-4797.
- Osborne J., Moore P. S., Chang Y.: "KSHV-encoded viral IL-6 activates multiple human IL-6 signaling pathways." *Human Immunology* 60 (1999): 921-927.
- Pauk J., Huang M. L., Brodie S. J.: "Mucosal shedding of human herpesvirus 8 in men." *The New England journal of medicine* 343 (2000): 1369-1377.
- Pellet C., Blum L., Chevret S., Agbalika F., Lebbé C.: "Analysis of HHV8 viral load in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from HIV-associated Kaposi's sarcoma." 2nd international workshop on KSHV/HHV8 1999.
- Pellet C., Chevret S., Blum L., Gauville C., Hurault M., Blanchard G., Agbalika F., Lascoux C., Ponscarne D., Morel P., Calvo F., Lebbe C.: "Virologic and immunologic parameters that predict clinical response of AIDS-associated Kaposi's sarcoma to highly active antiretroviral therapy." *Journal of investigating dermatology* 117 (2001): 858-863.
- Perez E., Barnadas M. A., Garcia-Patos V., Pedro C., Curell R., Sander C.A., Kind P., De Moragas J. M., Alomar A.: "Kaposi's sarcoma in a patient with erythroblastopenia and thymoma: Reactivation after topical corticosteroids." *Dermatology-Basel* 197 (1998): 264-267.
- Perna A. M., Bonura F., Vitale F., Viviano E., Di Benedetto A. M., Ajello F., Villafrate M. R., Prestileo T., Mancuso S., Goedert J. J., Romano N.: "Antibodies to human herpes virus type 8 (HHV8) in general population and in individuals at risk for sexually transmitted diseases in Western Sicily." *International Journal of Epidemiology* 29 (2000): 175-179.
- Pfrommer C., Tebbe B., Tidona C. A., Woelfer U., Krenzel S., Zeichardt H., Zouboulis C. C., Orfanos C. E.: "Progressive HHV8-positive classic Kaposi's sarcoma: Rapid response to interferon alpha-2a but persistence of HHV8-DNA sequences in lesional skin." *British Journal of Dermatology* 139 (1998): 516-519.
- Pinching A. J.: "Managing HIV disease after Delta." *British medical journal* 312 (1996): 521-522.

- Polis M. A., Sidorov I. A., Yoder C., Jankelevich S., Metcalf J., Mueller B. U., Dimitrov M. A., Pizzo P., Yarchoan R., Dimitrov D. S.: "Correlation between reduction in plasma HIV-1 RNA concentration 1 week after start of antiretroviral treatment and longer-term efficacy." *Lancet* 358 (2001): 1760-1765.
- Porter K., Babiker A., Bhaskaran K., Darbyshire J., Pezzotti P., Walker A. S.: "Determinants of survival following HIV-1 seroconversion after the introduction of HAART." *Lancet* 362 (2003): 1267-1274.
- Qiong J. Wang, Jenkins F. J., Jacobson L. P., Kingsley L. A., Day R. D., Zhang Z.-W., Meng Y. - X., Pellet P. E., Kousoulas K. G., Baghian A., Rinaldo Jr. C. R.: "Primary human herpesvirus 8 infection generates a broadly specific CD8⁺ T-cell response to viral lytic cycle proteins." *Blood* 97 (2001): 2366-2373.
- Regamey N., Tamm M., Wernli M.: "Transmission of human herpesvirus 8 infection from renal transplant donors to recipients." *The New England journal of medicine* 339 (1998): 1358-1363.
- Renwick N., Halaby T., Weverling G. J., Dukers N. H., Simpson G. R., Coutinho R. A., Lange J. M., Schulz T. F., Goudsmit J.: "Seroconversion for human herpesvirus 8 during HIV infection is highly predictive of Kaposi's sarcoma." *AIDS* 12 (1998): 2481-2488.
- Robles R., Lugo D., Gee L., Jacobson M. A. : "Effect of antiviral drugs used to treat cytomegalovirus end-organ disease on subsequent course of previously diagnosed Kaposi's sarcoma in patients with AIDS." *Journal of AIDS Human Retrovirology* 20 (1999): 34-38.
- Russo J. J. , Bohenzky R. A. , Chien M. - C. , Chen J. Yan M., Maddalena D., Parry J. P., Peruzzi D., Edelman I. S., Chang Y., Moore P. S.: "Nucleotide sequence of the Kaposi's sarcoma associated herpesvirus." *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America* 93 (1996): 14862-14867.
- Salzberger B., Rockstroh J., Wieland U.: "Clinical efficacy of protease inhibitor based antiretroviral combination therapy - a prospective cohort study." *European journal of medical research* 4 (1999): 449-455.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.: "Molecular cloning - a laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA
- Sande M. A., Carpenter C. C., Cobbs C. G., Holmes K. K., Sanford J. P.: "Antiretroviral therapy for adult HIV-infected patients. Recommendations from a state-of-the-art conference." *Journal of the American medical association* 270 (1993): 2583-2589.

- Sarid R, Olsen S. J., Moore P. S.: "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: epidemiology, virology, and molecular biology." *Advances in virus research* 52 (1999): 139-232.
- Schulz T. F.: "KSHV Infection." *Journal of Infection* 41 (2000): 125-129.
- Selik R. M, Starcher E. T, Curran J.W.: "Opportunistic diseases reported in AIDS patients: frequencies, associations, and trends." *AIDS* 1 (1987): 175-182.
- Serraino D., Toma L., Andreoni M., Buttò S., Tchangmena O., Sarmati L., Monini P., Franceschi S., Ensoli B., Rezza G.: "A seroprevalence study of human herpesvirus type 8 (HHV8) in eastern and Central Africa and in the Mediterranean area." *European Journal of Epidemiology* 17 (2001): 871-876.
- Sgadari C., Barillari G., Toschi E., Carlei D., Bacigalupo I., Baccarini, S.: "HIV protease inhibitors are potent anti-angiogenic molecules and promote regression of Kaposi sarcoma." *Nature Medicine* 8 (2002): 225-232.
- Sharpe M., Easthope S. E., Keating G. M., Lamb H. M.: "Polyethylene glycol-liposomal doxorubicin: a review of its use in the management of solid and haematological malignancies and AIDS-related Kaposi's sarcoma." *Drugs* 62 (2002): 2089-2126.
- Sirianni M. C., Vincenzi L., Topino S., Giovannetti A., Mazzetta F., Libi F.: "NK cell activity controls human herpesvirus 8 latent infection and is restored upon highly active antiretroviral therapy in AIDS patients with regressing Kaposi's sarcoma." *European Journal of Immunology* 32 (2002): 2711-2720.
- Smets F., Sokal E. M.: "Epstein-Barr virus-related lymphoproliferation in children after liver transplant: role of immunity, diagnosis, and management." *Pediatric Transplantation* 6 (2002): 280-287.
- Soulier J., Grollet L., Oksenhendler E., Cacoub P., Cazals-Hatem D., Babinet P., d'Agay M. F., Clauvel J. P., Raphael M., Degos L.: "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castleman's disease." *Blood* 86 (1995): 1276-1280.
- Staskus K. A., Sun R., Miller G.: "Cellular tropism and viral interleukin-6 expression distinguish human herpesvirus 8 involvement in Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma and multicentric Castleman's disease." *Journal of Virology* 73 (1999): 4181-4187.
- Staskus K. A., Zhong W., Gebhard K., Herndier B., Wang H., Renne R., Beneke J., Pudney J., Anderson D. J., Ganem D., Haase A. T.: "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression in endothelial (spindle) tumor cells." *Journal of virology* 71 (1997): 715-719.

- Staszewski S., Miller V., Sabin C., Berger A., Hill A. M., Phillips A. N.: "Rebound of HIV-1 viral load after suppression to very low levels." *AIDS* 12 (1998): 2360.
- Stebbing J., Portsmouth S., Gazzard B.: "How does HAART lead to the resolution of Kaposi's sarcoma?" *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51 (2003): 1095-1098.
- Taylor M. M., Chohan B., Lavreys L., Hassan W., Huang M. L., Corey L., Ashley Morrow R., Richardson B. A., Mandaliya K., Ndinya-Achola J., Bwayo J., Kreiss J.: "Shedding of human herpesvirus 8 in oral and genital secretions from HIV-1-seropositive and -seronegative Kenyan women." *Journal of Infectious Diseases* 190 (2004): 484-488.
- Thellin O., Zorzi W., Lakaye B., De Borman B., Coumans B., Hennen G., Grisar T., Igout A., Heinen E.: "Housekeeping genes as internal standards: use and limits". *Journal of Biotechnology* 75 (1999): 291-295.
- Tulpule A., Scadden D. T., Espina B. M.: "Results of a randomized study of IM862 nasal solution in the treatment on AIDS-related Kaposi's sarcoma." *Journal of clinical oncology* 18 (2000): 716-723.
- Varthakavi V., Browning P. J., Spearman P.: "Human Immunodeficiency Virus Replication in a Primary Effusion Lymphoma Cell Line Stimulates Lytic-Phase Replication of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus." *Journal of Virology* 73 (1999): 10329-10338.
- Viviano E., Vitale F., Ajello F., Perna A. M., Villafrate M. R., Bonura F., Arico M., Mazzola G., Romano N.: "Human herpesvirus type 8 DNA sequences in biological samples of HIV-positive and negative individuals in Sicily." *AIDS* 11 (1997): 607-612.
- Wahren B., Eriksson B.: "Cytomegalovirus DNA polymerase inhibition and kinetics." *Advances in enzyme regulation* 23 (1985): 263-274.
- Wang L., Wakisaka N., Tomlinson C. C.: "The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) K1protein induces expression of angiogenic and invasion factors." *Cancer Research* 64 (2004): 2774-2781.
- Walsh J. C., Dalton M., Gazzard B. G.: "Adherence to combination antiretroviral therapy assessed by anonymous patient self-report." *AIDS* 12 (1998): 2361-2363.
- Whitby D., Luppi M., Barozzi P.: "Human herpesvirus 8 seroprevalence in blood donors and lymphoma patients from different regions of Italy." *Journal of international Cancer Institute* 90 (1998): 395-397.

- Wilkinson J., Cope A., Gill J., Bourboulia D., Hayes P., Imami N., Kubo T., Marcelin A., Calvez V., Weiss R., Gazzard B., Boshoff C., Gotch F.: "Identification of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (KSHV)-Specific Cytotoxic T-Lymphocyte Epitopes and Evaluation of Reconstitution of KSHV-Specific Responses in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patients Receiving Highly Active Antiretroviral Therapy." *Journal of Virology* 76 (2002): 2634-2640.
- Zhong H., Simons J. W.: "Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia." *Biochemical and biophysical research communications* 259 (1999): 523-526.
- Ziegler J., Newton R., Bourboulia D., Casabonne D., Beral V., Mbidde E., Carpenter L., Reeves G., Parkin D. M., Wabinga H., Mbulaiteye S., Jaffe H., Weiss R., Boshoff C.: "Risk factors for Kaposi's sarcoma: a case-control study of HIV-seronegative people in Uganda." *Internal Journal of Cancer* (103) 2003: 233-240.
- Zoetewij J. P., Moses A. V., Rinderknecht A. S., Davis D. A., Overwijk W. W., Yarchoan R., Orenstein J. M., Blauvelt A.: "Targeted inhibition of calcineurin signaling blocks calcium-dependent reactivation of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus." *Blood* 97 (2001): 2374-2380.
- Zong J. C., Metroka C., Reitz M. S., Nicholas J., Hayward G. S.: "Strain variability among Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genomes: evidence that a large cohort of United States AIDS patients may have been infected by single common isolate." *Journal of Virology* 71 (1997): 2505-2511.

8 Anhang

8.1 Liste der verwendeten Abkürzungen

ΔR_N -Wert:	R_N -Wert minus dem Reporter-Signal vor der PCR
ART:	Anti-retrovirale Therapie
ATRA:	all-trans retinoic acid (engl.)
BCBL-1 Zellen:	body cavity based lymphoma Zellen
BFGF:	basic fibroblastic growth factor (engl.)
bp:	Basenpaar
CCD:	"Charge Coupled Device": ladungsgekoppelte Halbleiterelemente.
CDC:	Centers for Disease Control
CMV:	Zytomegalievirus (engl.: cytomegalovirus)
C_T -Wert:	Threshold Cycle
DNA:	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
dNMP:	Desoxy-Nukleosidmonophosphat
EBV:	Ebstein-Barr-Virus
EtBr:	Ethidiumbromid
GAPDH:	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
Geq:	Genomäquivalente (engl.: genome equivalents)
HAART:	highly active antiretroviral therapy (engl.)
HBV:	Hepatitis B Virus
HHV-8:	Humanes Herpesvirus 8
HSV:	Herpes-Simplex-Virus
KS:	Kaposi-Sarkom
KSHV:	Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (engl.)
LAN:	Linker-Arm-modifiziertes-Nukleotid
LANA:	latency-associated nuclear antigen (engl.)
LAS:	persistierende generalisierte Lymphadenopathie
logN:	natürlicher Logarithmus

MCD:	multizentrische Castlemansche Erkrankung (engl.: multicentric Castleman´s disease)
MgCl ₂ :	Magnesium(II)-Chlorid
NK-Zellen:	Natürliche Killerzellen
NNRTI:	Nicht-nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren
NRTI:	Nukleosidanalogue Reverse Transkriptase Inhibitoren
NTC:	no template control (engl.)
OD ₂₆₀ :	optische Dichte bei 260 nm
ORF 26:	open reading frame 26
p:	Überschreitungswahrscheinlichkeit
PBMC:	peripheral blood mononuclear cells (engl.)
PCR:	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PEL:	Primäres Erguss Lymphom (engl.: primary effusion lymphoma)
PTLD:	post-transplant lymphoproliferative disease (engl.)
R _N -Wert:	normalisiertes Reporterpotential
R _n -Wert:	normalisiertes Reportersignal
Tat:	Transactivating Protein
T _m :	Schmelztemperatur
TPA:	Polypeptidantigen (engl.: tissue polypeptide antigen)
UNG:	Uracil-N-Glykosylase
UTP:	Uridintriphosphat
vbcl-2:	virales bcl-2 (B-cell-leukemia/lymphoma 2)
VEGF:	vascular endothelial growth factor (engl.)
vFLIP:	viral Fas-associated death domain-like interleukin 1 β-converting enzyme (engl.)
vIL-6:	virales Interleukin-6
WHO :	world health organization (engl.)

8.2 Ergebnistabelle

Parameter:

Patientennummer: chronologisch nach dem Abnahmedatum sortiert

HHV-8 Viruslast: Geq/1x10⁴ Zellen

CD4: CD4-Zellzahl absolut/ μ l

KS: KS 0 = kein Kaposi-Sarkom; KS 1 = klinisch manifestes Kaposi-Sarkom

HIV-VL: HIV Viruslast in logarithmischer Angabe

HAART: HAART 0 = keine anti-retrovirale Therapie; HAART 1 = Einnahme einer anti-retroviralen Therapie

Aciclovir/Ganciclovir/Foscarnet: 0 = keine Therapie mit dem jeweiligen Medikament; 1 = Therapie mit dem jeweiligen Medikament

CD4 200: Dichotomisierung der CD4-Zellzahl in zwei Gruppen: 0 = CD4-Zellzahl < 200/ μ l; 1 = CD4-Zellzahl \geq 200/ μ l

CD4 500: Dichotomisierung der CD4-Zellzahl in zwei Gruppen: 0 = CD4-Zellzahl < 500/ μ l; 1 = CD4-Zellzahl \geq 500/ μ l

CD425: Trichotomisierung der CD4-Zellzahl in drei Gruppen: 0 = CD4-Zellzahl < 200/ μ l; 1 = CD4-Zellzahl zwischen 200/ μ l und 499/ μ l; 2 = CD4-Zellzahl \geq 500/ μ l

Patienten- nummer	HHV-8 Viruslast	CD4	KS	HIV- VL	HAART	Aci- clovir	Gan- ciclovir	Fos- carnet	CD4 200	CD4 500	CD425
006	2173	578	0	4,07	1	0	0	0	1	1	2
008	0	250	0	0	1	0	0	0	1	0	1
009	11	450	0	3,43	0	0	0	0	1	0	1
010	1	349	0	0	1	0	0	0	1	0	1
013	3	269	1	4,99	0	0	0	0	1	0	1
019	0	257	0	5,63	1	0	0	0	1	0	1
021	2	510	0	2,7	1	0	0	0	1	1	2
028	0	273	0	0	1	0	0	0	1	0	1
039	0	14	1	2,92	1	0	0	0	0	0	0
045	6	911	0	0	1	0	0	0	1	1	2
048	6	209	0	4,43	1	1	0	0	1	0	1
049	0	195	0	4,32	0	0	0	0	0	0	0
057	13	511	0	5,25	0	0	0	0	1	1	2
061	1594	144	0	3,02	1	0	0	0	0	0	0
062	11	774	0	0	1	0	0	0	1	1	2
070	0	156	0	0	1	0	0	0	0	0	0
074	0	350	0	3,26	1	0	0	0	1	0	1
076	0	0	0	3,5	1	1	0	0	0	0	0
077	2	140	0	0	1	0	0	0	0	0	0
079	0	286	0	0	1	1	0	0	1	0	1
083	0	172	0	0	1	0	0	0	0	0	0
088	0	248	0	0	1	0	0	0	1	0	1
092	3	578	0	4,07	1	0	0	0	1	1	2
096	0	546	0	0	1	0	0	0	1	1	2
097	0	305	0	4,33	1	0	0	0	1	0	1
098	0	192	0	0	1	0	0	0	0	0	0
102	0	180	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Patienten- nummer	HHV-8 Viruslast	CD4	KS	HIV- VL	HAART	Aciclovir	Ganciclovir	Foscarnet	CD4 200	CD4 500	CD425
103	3	90	0	0	1	1	0	0	0	0	0
104	1	1095	0	0	1	0	0	0	1	1	2
105	0	410	0	3,09	1	1	0	0	1	0	1
106	3	164	0	3,74	1	0	0	0	0	0	0
107	0	392	0	0	1	1	0	0	1	0	1
112	0	545	1	4,11	0	0	0	0	1	1	2
113	61	269	0	0	1	0	0	0	1	0	1
118	7	651	0	0	1	1	0	0	1	1	2
135	227	653	0	0	1	0	0	0	1	1	2
136	1234	13	0	5,6	0	1	1	0	0	0	0
138	94	335	0	4,14	1	0	1	0	1	0	1
139	49	194	0	4,44	1	1	0	0	0	0	0
142	0	439	0	0	1	0	0	0	1	0	1
144	3	321	0	0	1	1	0	0	1	0	1
146	34	78	0	4,54	1	0	0	0	0	0	0
149	1653	226	0	3,39	1	0	0	0	1	0	1
151	156	76	0	4,17	1	0	0	0	0	0	0
152	0	534	0	4,68	1	0	0	0	1	1	2
159	0	335	0	4,14	1	1	0	0	1	0	1
167	23	410	0	3,45	1	0	0	0	1	0	1
168	7	18	0	5,31	1	1	0	0	0	0	0
169	17	385	0	3,26	1	0	0	0	1	0	1
182	6	581	1	0	1	1	0	0	1	1	2
183	110	458	1	4,26	0	0	0	0	1	0	1
185	466	51	1	0	0	0	0	0	0	0	0
186	0	320	1	3,37	1	1	0	1	1	0	1
187	0	327	0	0	1	0	1	1	1	0	1
188	0	238	0	2,74	1	0	0	0	1	0	1

Patienten- nummer	HHV-8 Viruslast	CD4	KS	HIV- VL	HAART	Aci- clovir	Gan- ciclovir	Fos- carnet	CD4 200	CD4 500	CD425
189	0	221	0	0	1	0	0	0	1	0	1
193	0	99	1	5,51	1	1	0	0	0	0	0
198	7	508	0	3,31	1	0	0	0	1	1	2
201	2	599	0	0	1	0	0	0	1	1	2
205	0	200	0	4,58	1	1	0	0	1	0	1
207	0	153	0	0	1	0	0	0	0	0	0
208	0	274	0	0	1	1	0	0	1	0	1
212	0	592	0	4,68	1	0	0	0	1	1	2
213	8	339	0	0	1	0	0	0	1	0	1
215	152	388	1	0	1	1	1	1	1	0	1
217	196	388	1	3,55	1	0	0	0	1	0	1
218	24	388	1	3,55	1	0	0	0	1	0	1
219	56	11	0	5,02	1	0	0	0	0	0	0
220	0	388	1	0	1	1	1	1	1	0	1
222	12	669	0	0	1	0	0	0	1	1	2
224	20	152	1	2,69	1	0	0	0	0	0	0
225	0	662	0	5,09	1	1	0	0	1	1	2
226	0	487	0	0	1	0	0	0	1	0	1
227	0	343	0	0	1	0	0	0	1	0	1
228	22	246	0	3,65	1	0	0	0	1	0	1
229	9	162	0	0	1	0	0	0	0	0	0
231	0	158	0	4,58	1	1	0	0	0	0	0
232	0	332	0	4,04	1	0	1	0	1	0	1
233	15	316	0	4,24	1	0	0	0	1	0	1
235	0	321	0	0	1	0	0	0	1	0	1
237	0	179	0	3,67	1	1	0	0	0	0	0
238	0	400	0	4,29	0	0	0	0	1	0	1
240	0	388	1	0	1	1	1	1	1	0	1

Patienten- nummer	HHV-8 Viruslast	CD4	KS	HIV- VL	HAART	Aci- clovir	Gan- ciclovir	Fos- carnet	CD4 200	CD4 500	CD425
241	6	323	0	0	1	0	0	0	1	0	1
242	579	103	0	4,64	1	0	0	0	0	0	0
243	0	150	0	5,01	1	0	0	0	0	0	0
244	0	357	0	4,07	0	0	0	0	1	0	1
245	0	449	0	0	1	0	0	0	1	0	1
246	0	304	0	0	1	0	0	0	1	0	1
249	0	284	0	0	1	0	0	0	1	0	1
250	0	347	0	4,77	1	0	0	0	1	0	1
252	4	469	0	0	1	0	0	0	1	0	1
253	1	348	0	5,27	1	0	0	0	1	0	1
254	5	310	0	2,7	1	1	0	0	1	0	1
255	0	287	0	3,78	1	1	0	0	1	0	1
256	28	663	0	3,45	0	0	0	0	1	1	2
261	34	328	0	3,01	0	0	0	0	1	0	1
262	1	2	0	5,73	0	1	0	0	0	0	0
264	39	274	0	0	1	0	1	1	1	0	1
267	0	402	0	3,84	1	1	0	0	1	0	1
269	117	299	0	0	1	0	0	0	1	0	1
272	2120	413	0	4,38	1	0	0	0	1	0	1
273	2183	508	0	3,13	1	0	0	0	1	1	2
274	234	408	1	0	1	0	0	0	1	0	1
278	12	173	0	4,19	0	0	0	0	0	0	0
279	0	1053	0	0	1	0	0	0	1	1	2
282	1	281	0	4,11	1	0	0	0	1	0	1
284	0	189	0	3,83	1	0	0	0	0	0	0
288	7	108	0	0	1	0	0	0	0	0	0
290	8	528	0	0	1	0	0	0	1	1	2
291	2	129	0	5,57	1	1	0	0	0	0	0

Patienten- nummer	HHV-8 Viruslast	CD4	KS	HIV- VL	HAART	Aci- clovir	Gan- ciclovir	Fos- carnet	CD4 200	CD4 500	CD425
292	133	173	0	4,19	0	0	0	0	0	0	0
293	21	839	0	0	1	0	0	0	1	1	2
296	36	230	0	0	1	0	0	0	1	0	1
297	1256	231	0	0	1	0	0	0	1	0	1
300	3	505	0	4,14	1	0	0	0	1	1	2
303	2	428	0	0	1	0	0	0	1	0	1
308	0	536	0	0	1	0	0	0	1	1	2
309	670	349	0	0	1	0	0	0	1	0	1
311	100	457	0	0	1	0	0	0	1	0	1
316	4	626	0	0	1	0	0	0	1	1	2
317	0	40	0	5,56	1	0	0	0	0	0	0
318	0	255	0	3,46	1	0	0	0	1	0	1
323	0	424	0	0	1	0	0	0	1	0	1
324	10	98	0	4,31	0	0	0	0	0	0	0
328	1449	98	0	4,31	0	0	0	0	0	0	0
330	0	8	0	5,06	1	1	0	0	0	0	0
331	691	408	0	0	1	0	1	0	1	0	1
332	415	166	0	4,71	1	0	0	0	0	0	0
335	2	349	0	0	1	0	0	0	1	0	1
337	18	78	0	4,49	1	0	0	0	0	0	0
338	27	189	0	3,83	1	0	0	0	0	0	0
341	0	475	0	0	1	0	0	0	1	0	1
342	0	460	0	0	1	0	0	0	1	0	1
345	7	414	0	0	1	0	0	0	1	0	1
346	22	72	0	0	1	1	0	0	0	0	0
350	0	125	0	2,8	1	0	0	0	0	0	0
352	0	458	0	0	1	1	0	0	1	0	1
353	0	497	1	0	1	1	0	0	1	0	1

Patienten- nummer	HHV-8 Viruslast	CD4	KS	HIV- VL	HAART	Aci- clovir	Gan- ciclovir	Fos- carnet	CD4 200	CD4 500	CD425
357	17	5	0	4,87	1	1	0	0	0	0	0
358	0	242	0	3,31	1	0	0	0	1	0	1
360	0	514	0	0	1	0	0	0	1	1	2
365	6	208	0	0	1	0	0	0	1	0	1
367	34	548	0	0	1	0	0	0	1	1	2
368	0	175	0	0	1	1	0	0	0	0	0
369	36	19	1	4,42	1	1	0	0	0	0	0
374	0	318	0	0	1	0	0	0	1	0	1
379	0	148	0	4,7	1	1	0	0	0	0	0
385	22	345	0	3,09	1	1	0	0	1	0	1
386	0	465	0	5,03	1	1	0	0	1	0	1
387	12	475	0	0	1	0	0	0	1	0	1
389	24	198	0	0	1	0	0	0	0	0	0
393	6	736	0	0	1	0	0	0	1	1	2
395	32	446	0	3,6	1	0	0	0	1	0	1
396	1966	19	1	4,42	1	1	0	0	0	0	0
398	13	42	0	5,13	0	0	0	0	0	0	0
401	10	176	0	2,86	1	0	0	0	0	0	0
402	13	30	0	5,6	0	0	0	0	0	0	0
403	39	738	0	0	1	0	0	0	1	1	2
410	0	237	0	5,37	1	1	0	0	1	0	1
412	0	221	0	0	1	0	0	0	1	0	1
427	0	73	0	4,65	1	1	0	0	0	0	0
438	0	325	0	0	0	0	0	0	1	0	1
443	84	748	0	0	1	0	0	0	1	1	2
445	0	532	1	0	1	1	1	1	1	1	2
451	405	23	0	5,45	1	1	0	0	0	0	0
455	14	645	1	3,29	1	1	0	0	1	1	2

Patienten- nummer	HHV-8 Viruslast	CD4	KS	HIV- VL	HAART	Aci- clovir	Gan- ciclovir	Fos- carnet	CD4 200	CD4 500	CD425
460	14	304	0	3,52	1	1	0	0	1	0	1
466	0	197	0	0	1	0	0	0	0	0	0
467	0	358	0	4,24	1	0	0	0	1	0	1
468	0	131	0	5,26	1	1	0	0	0	0	0
469	14	253	0	4,67	1	1	0	0	1	0	1
475	0	499	0	0	1	0	0	0	1	0	1
477	107	213	0	3,45	1	0	0	0	1	0	1
485	63	331	0	2,41	1	0	0	0	1	0	1
493	0	225	0	3,33	1	0	0	0	1	0	1
494	24	40	0	5,48	1	0	0	0	0	0	0
495	0	284	0	3,23	1	0	0	0	1	0	1
497	179	19	1	4,71	1	1	0	0	0	0	0
500	190	363	1	0	1	0	0	0	1	0	1
504	666	395	0	4,05	1	0	0	0	1	0	1
510	63	259	0	4,17	1	1	0	0	1	0	1
511	9	763	0	2,82	1	0	0	0	1	1	2
512	269	18	0	4,66	1	1	0	0	0	0	0
513	23	641	0	4,19	1	0	0	0	1	1	2
525	2	610	0	4,83	1	0	0	0	1	1	2
526	0	125	0	2,8	1	0	0	0	0	0	0
528	0	839	0	0	1	0	0	0	1	1	2
535	0	98	0	4,31	1	0	0	0	0	0	0
537	0	0	0	3,89	1	0	0	0	0	0	0
547	0	306	1	2,38	1	0	0	0	1	0	1
548	0	860	0	0	1	0	0	0	1	1	2
549	0	453	0	2,84	1	0	1	0	1	0	1
551	15	480	0	3,86	1	0	0	0	1	0	1
554	0	395	0	4,1	0	0	0	0	1	0	1

Patienten- nummer	HHV-8 Viruslast	CD4	KS	HIV- VL	HAART	Aci- clovir	Gan- ciclovir	Fos- carnet	CD4 200	CD4 500	CD425
555	128	76	0	4,83	1	1	0	0	0	0	0
558	2484	5	1	5,15	1	0	0	0	0	0	0
561	0	526	0	0	0	0	0	0	1	1	2
563	0	219	0	0	0	0	0	0	1	0	1
565	60	351	0	2,59	1	0	0	0	1	0	1
566	2	1119	0	4,48	1	0	0	0	1	1	2
568	18	288	0	3,72	1	1	0	0	1	0	1
569	0	106	0	0	1	0	0	0	0	0	0
572	79	395	0	4,05	1	0	0	0	1	0	1
573	5	346	0	0	1	0	1	0	1	0	1
575	184	442	0	0	1	0	0	0	1	0	1
576	139	364	0	0	1	1	0	0	1	0	1
577	0	433	0	0	1	1	0	0	1	0	1
581	0	114	0	4,33	1	1	0	0	0	0	0
584	0	340	0	3,41	0	0	0	0	1	0	1
589	0	513	0	3,12	1	0	0	0	1	1	2
591	21	259	1	2,67	1	0	0	0	1	0	1
594	0	322	0	3,48	1	0	0	0	1	0	1
595	0	416	0	0	1	0	1	1	1	0	1
596	0	149	0	3,3	1	0	1	0	0	0	0
599	0	513	0	0	0	0	0	0	1	1	2
601	0	666	0	3,95	1	0	0	0	1	1	2
603	145	87	1	0	1	0	0	0	0	0	0
605	387	79	0	4,16	1	1	0	0	0	0	0
606	328	788	0	0	1	0	0	0	1	1	2
607	0	411	0	0	1	0	0	0	1	0	1
608	213	369	0	0	1	0	0	0	1	0	1
609	193	104	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Patienten- nummer	HHV-8 Viruslast	CD4	KS	HIV- VL	HAART	Aci- clovir	Gan- ciclovir	Fos- carnet	CD4 200	CD4 500	CD425
611	16	5	0	0	1	1	1	0	0	0	0
613	3360	63	1	5,7	0	0	0	0	0	0	0
614	304	7	1	4,4	1	1	0	0	0	0	0
615	0	99	0	5,14	1	1	0	0	0	0	0
616	1054	449	0	0	1	0	0	0	1	0	1
617	10994	261	0	0	1	0	0	0	1	0	1
618	0	118	1	3,48	1	0	0	0	0	0	0
622	0	114	1	4,86	1	1	0	1	0	0	0
623	457079	84	1	4,85	0	0	0	0	0	0	0
627	13	7	0	4,4	0	0	0	0	0	0	0
631	0	112	0	0	1	0	0	0	0	0	0

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.	HHV-8 Genom.....	5
Abb. 2.	PCR Prinzip.....	16
Abb. 3.	Das Prinzip der TaqMan [®] PCR	17
Abb. 4.	Skalierte Farbintensitäten einer TaqMan [®] Versuchsreihe	29
Abb. 5.	Typische Amplifikationskurven von ORF26-Standardverdün- nungen.	30
Abb. 6.	Standardkurve der HHV-8 TaqMan [®] PCR.....	31
Abb. 7.	Negativkontrollen	32
Abb. 8.	Bestimmung der Zellzahl mittels TaqMan [®] PCR für das „human acidic ribosomal protein“	34
Abb. 9.	Korrelation zwischen der HIV-1 Viruslast und der HHV-8 Viruslast.	36
Abb. 10.	Einfluss der anti-retroviralen Therapie (HAART) auf den Zusammenhang zwischen HIV-1 Viruslast und HHV-8 Viruslast ...	37
Abb. 11.	Abhängigkeit der HHV-8 Viruslast von der CD4-Zellzahl	39
Abb. 12.	Abhängigkeit der HHV-8 Viruslast von der CD4-Zellzahl bei Patienten ohne und mit (HA)ART	41
Abb. 13.	Einfluss virostatisch wirksamer Medikamente auf die HHV-8 Viruslast	44

8.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Sequenzen der verwendeten Primer und Sonde	20
Tabelle 2:	Mastermix für TaqMan® PCR.....	21
Tabelle 3:	Zugabe der Proben zum PCR-Mastermix	22
Tabelle 4:	Thermocycler-Programm für HHV-8 TaqMan® PCR	22
Tabelle 5:	Mastermix für TaqMan® PCR mit Human Ribosomal Protein Kit.....	26
Tabelle 6:	Zugabe der DNA-Proben zum PCR Mastermix.....	26
Tabelle 7:	Thermocycler-Programm für TaqMan® PCR mit Human Ribosomal Protein Kit.....	26
Tabelle 8:	Lagerung der Substanzen.....	28
Tabelle 9:	Kreuztabelle: Kaposi-Sarkom Vorkommen bei HHV-8 negativen und bei HHV-8 positiven Patienten	35
Tabelle 10:	Kreuztabelle: Kaposi-Sarkom Vorkommen in Abhängigkeit von Aciclovir.....	45
Tabelle 11:	Kreuztabelle: Kaposi-Sarkom Vorkommen in Abhängigkeit von Ganciclovir	46
Tabelle 12:	Kreuztabelle: Kaposi-Sarkom Vorkommen in Abhängigkeit von Foscarnet	46
Tabelle 13:	Kreuztabelle: Kaposi-Sarkom Vorkommen in Abhängigkeit von HAART	47

9 Eigene Publikationen

Dušan Prevalšek, Octavian Schatz and Jürgen Haas: "Inverse correlation of HHV-8 viral load with CD4 cell counts in HIV-1 infected individuals." *Infection* 30 (Suppl.1; 2002): 34.

10 Danksagung

Auch diese Arbeit konnte nur durch die Hilfe und Unterstützung vieler Menschen entstehen, bei denen ich mich an dieser Stelle bedanken möchte.

Ein herzlicher Dank gilt Herrn PD Dr.med. Dr.rer.nat. Jürgen Haas für die fortwährende Unterstützung und Betreuung meiner Doktorarbeit am Max-von-Pettenkofer Institut für Virologie am Genzentrum in München.

Herrn Prof. Ulrich Koszinowski danke ich für die hervorragende Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Frank-Detlef Goebel, Herrn Prof. Dr. Johannes Bogner und Herrn Dr. Oktavian Schatz der Infektionsambulanz und Tagesklinik der Medizinischen Poliklinik der LMU München danke ich für die freundliche Bereitstellung der Blutproben und der weiteren medizinischen Daten.

Herrn Dr.rer.nat. Hans Nitschko und Frau Helga Mayrhofer möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen für die Bereitstellung der TaqMan[®]-Anlage und für die sehr engagierte, freundliche und tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Versuchsreihen. Außerdem danke ich ihnen für die zahlreichen Hilfestellungen sowie fruchtbaren und interessanten Diskussionen.

Für die Betreuung und Lösung meiner Probleme mit der statistischen Auswertung danke ich Frau Dipl.-Stat. Sibel Aydemir vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie (IBE) der LMU München.

Der Arbeitsgruppe Haas, meinen Kollegen im Labor und auf dem Stockwerk danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen Hilfestellungen, besonders zu nennen sind Christine Atzler, Alexander Ege und Walter Muranyi. Den medizinisch-technischen Assistentinnen der Virologie des Max-von-Pettenkofer Instituts möchte ich herzlich für die vielen Tipps bezüglich der Arbeit mit dem TaqMan[®]-Gerät danken.

Einen lieben Dank an meine Eltern, meine Schwester und meine Freunde während dieser Zeit, die mich moralisch und auch fachlich unterstützt haben: Michelle Lentner-Foye, Susanne Pain, Torsten Krumbach, Miran Javorovič und Michael Goretzki.

11 Lebenslauf

Name: Dušan Prevalšek

Geburtsdatum: 02. November 1974

Geburtsort: Jesenice/Slowenien

Schulbildung:

Grundschule Vogelsang Stuttgart 1981-1985

Dillmann-Gymnasium Stuttgart 1985-1994

Studium:

Chemiestudium Universität Stuttgart Oktober 1994-Februar 1995

Humanmedizinstudium Justus-Liebig- April 1996-April 1998

Universität Giessen

Ludwig-Maximilians- April 1998-April 2002

Universität München

Doktorarbeit Ludwig-Maximilians- April 1999-Oktober 2005

Universität München

(Max-von-Pettenkofer

Institut)

Ärztliche Ausbildung:

Arzt im Praktikum Krankenhaus München Juli 2002-Januar 2004

Schwabing (Hämato-

Onkologie)

Assistenzarzt Krankenhaus München Januar 2004-Februar 2005

Schwabing (Hämato-

Onkologie)

Klinikum Großhadern seit März 2005

KMT