

Frauke Liana Bellos
Dr. med.

Untersuchung des Zusammenhanges zwischen dem Kaposi-Sarkom assoziierten Herpesvirus und dem Multiplen Myelom

Geboren am 27.05.1974 in Karlsruhe
Staatsexamen am 10.05.2001 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktorvater: Prof. Dr. med. H. Goldschmidt

Die Onkogenese des MM ist unvollständig geklärt. Als ursächlich für die Entstehung werden sowohl Strahlenbelastung, toxische Einflüsse und genetische Ursachen diskutiert. Eine multi-step-Entwicklung bis hin zur malignen Zelle wird angenommen. Hierfür spricht auch die Entdeckung multipler genetischer und chromosomaler Aberrationen in den malignen Zellen. Die Ursprungszelle des MM wurde als eine reife, bereits Antigen-selektionierte B- oder Gedächtniszelle vor dem „class-switching“ identifiziert. Im KM stehen die malignen Zellen in engem Kontakt mit den dort vorhandenen Stromazellen, welche für das Überleben der malignen Zellen wichtige Zytokine wie z.B. IL-6 und Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF) produzieren.

Im Sommer 1997 wurde erstmalig über eine Infektion der Stromazellen von MM-Patienten mit dem KSHV berichtet. Dieses Virus ist in der Lage, Zytokine zu produzieren (vIL-6, vIRF, vCyclinD), welche Homologien zu den entsprechenden menschlichen Zytokinen haben. Ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der Infektion der Stromazellen des KM und der Entwicklung eines MM wurde **postuliert**. In der vorliegenden Arbeit wurden aus dem KM kultivierte Stromazellen und DC sowie LP von Patienten mit MM und MGUS auf eine Infektion mit dem KSHV untersucht. Diese Zelltypen wurden gewählt, da zuvor eine Infektion dieser Zellen durch das KSHV beschrieben wurde. Entsprechend der Erstbeschreiber der KSHV-Etiologie des MM wurden KM-MNC in eine Flüssigkultur ohne Wachstumsfaktoren gegeben.

Als Ausgangsmaterial zur Generierung von DC dienten KM-Aspirate. Die adhärente Fraktion der KM-MNC wurde in zwei unterschiedlichen Systemen kultiviert. Eines dieser Kultursysteme enthielt die Zytokine GM-CSF, IL-4 sowie TNF . Um eine größere Menge an DC generieren zu können, wurden KM-MNC zusätzlich in einem Flüssigmedium mit GM-CSF, SCF, IL-4 und Flt3L inkubiert.

Die kultivierten Zellen wurden lichtmikroskopisch hinsichtlich ihrer Morphologie untersucht sowie durchflusszytometrisch analysiert. Lichtmikroskopisch konnten in der Stromazellkultur Monozyten/Makrophagen und Fibroblasten-ähnliche Zellen gesehen werden. Nur ca. 30-40% der Zellen zeigten periplasmatische Zellfortsätze, wie sie bei DC vorkommen. Zellen, welche in den Zytokin-stimulierten Kulturen generiert wurden, bildeten Aggregate aus Zellen mit Zellausläufern, wie sie bei den DC beschrieben wurden. Teilweise sah man eine Formierung von Riesenclustern aus Hunderten von Zellen. Neben diesen DC gab es nur vereinzelt Fibroblasten- und Makrophagen-ähnliche Zellen.

Durchflusszytometrisch zeigte sich, dass die Stromazellen zu durchschnittlich 38% den Monozytenmarker CD14 und nur in 0,4% den DC-Marker CD1a exprimierten, während die Zellen aus den DC-Kulturen den DC-Marker CD1a zu durchschnittlich 41% (Typ 2) und 24% (Typ 3), sowie DC-typische Kostimulationsmoleküle wie CD80 und CD86 trugen. Somit wurde sowohl morphologisch als auch immunzytologisch nachgewiesen, dass in den eingesetzten Kultursystemen DC generiert werden konnten.

Um die kultivierten Stromazellen, DC und die LP von Patienten mit MM auf ihre Infektion mit dem KSHV zu untersuchen, wurde die DNA der Zellen extrahiert. Es wurde eine sensitive nested PCR zum Nachweis von KSHV-DNA etabliert. Mit dieser PCR wurden die Zellen aus 40 Kulturen von 22 Patienten mit MM und einem Patienten mit MGUS sowie LP von 35 Patienten mit MM untersucht. Im Anschluss daran wurden die erhaltenen PCR-Produkte mit einer selbst hergestellten KSHV spezifischen Sonde hybridisiert. Nested PCR und Hybridisierung wiesen bei keinem der Patienten KSHV in den Stromazellen, DC oder LP nach. Experimente mit DNA aus LP von acht Patienten ergaben Amplifikationsprodukte, welche im Größenbereich des erwarteten spezifischen Produktes lagen. Die Positivkontrolle sowie diese PCR-Produkte wurden kloniert und anschließend sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der KS330₂₃₃-Sequenz sowie mit anderen bekannten menschlichen und tierischen Sequenzen verglichen. Es zeigte sich eine Übereinstimmung der Sequenz der von uns eingesetzten Positivkontrolle zu der publizierten KS330₂₃₃-Sequenz. Bei keiner der PCR-Produkte aus Patienten-DNA konnte eine Übereinstimmung mit der KS330₂₃₃-Sequenz gefunden werden. Zwei der acht untersuchten Sequenzen zeigten auffällige Homologien zu den in der ersten Amplifikationsrunde eingesetzten Primern mit einer acht Basenpaar langen Übereinstimmung am 3'-Ende. Insgesamt wurde in dieser Arbeit kein Hinweis auf eine Infektion der Stromazellen, DC oder LP von Patienten mit MM gefunden. Dieses Ergebnis schließt einen Zusammenhang zwischen dem KSHV und dem MM bei den Heidelberger Myelompatienten mit großer Sicherheit aus.