

# Humant herpesvirus type 8 i orale Kaposis sarkomer

## Anvendt molekylær patologi

**Gitte Gregers, Inge Stage og Henning Lindeberg**

Ved moderne dna-teknik blev der i 1994 fundet et nyt herpesvirus i Kaposis sarkom hos aids-patienter. Siden har man fundet dette virus også i Kaposis sarkomer hos non-aids-patienter, i maligne lymfomer samt i orale aftøse ulcera hos aids-patienter. Det er den foreløbige opfattelse at man står over for et nyt onkogenet dna-virus. I dette arbejde gives en kort orientering om det nyopdagede herpesvirus, og HHV-8 påvises ved PCR og filterhybridisering i tre intraorale Kaposis sarkomer fra to aids-patienter.

Artiklen er baseret på stud.odont. Gitte Gregers' projektopgave.

I 1994 beskrev *Chang et al.* (1) herpesviruslignende dna-sekvenser i Kaposis sarkomer (KS) fra patienter med aids. Efter verificering af andre grupper (2) fik det nyopdagede virus betegnelsen KSHV (Kaposis Sarkom Herpes Virus), senere ændret til humant herpesvirus type 8 (HHV-8).

Herpesvirus inddeles i alpha-, beta- og gammaherpesvirinae. Foruden humanpatogene typer findes talrige herpesvirus som kun forekommer hos forskellige dyrearter. Oplysninger herom kan hentes på Internettet (3). Der findes indtil videre otte humane herpesvirus (Tabel 1). Herpesvirusgenomet består af dobbeltstrengt dna, 150.000-180.000 basepar (bp). HHV-8 er et gammaherpesvirus, relateret til Epstein-Barr virus og HVS (*HerpesVirus Saimiri*). Længden er opgivet til 140.500 bp (4).

Siden *Chang et al.s* opdagelse (1) er HHV-8 fundet i næsten alle KS fra aids-patienter, men også i KS fra hiv-negative patienter samt i visse lymfomer.

Indtil videre er PCR-teknik (*Polymerase Chain Reaction*) den eneste måde hvorpå HHV-8 kan påvises.

### PCR

PCR er en metode til amplifikation af korte dobbeltstrengede dna-fragmenter (5). I almindelighed er forudsætningen at dna-sekvensen er kendt. Princippet går ud på at der fremstilles modsatrettede korte enkeltstrengede dna-stykker der flankerer det fragment der ønskes amplificeret. Sådanne dna-stykker kaldes primere eller oligo-dna. Ved PCR skiftevis opvarmes og afkøles target-dna (dvs. det stykke dna man ønsker amplificeret) og primere i en passende buffer som desuden indeholder enkeltmuklotiderne dATP, dTTP, dCTP og dGTP (dvs. de »byggesten« der danner dna – her sammenfattet som dNTP) og en varmestabil dna-polymerase, oftest Taq-polymerase. Ved opvarmning til 95°C denaturerer dobbeltstrengt dna, ved afkøling til 55°C hybridiserer primerne til det denaturerede *target*-dna, og ved efterfølgende opvarmning til 72°C katalyserer dna-polymerasen en betinget syntese af dna som er homologt til de to strenge (Fig. 1). Efter 30-40 cykler har man amplificeret udgangsmaterialet med en faktor på  $2^{30}$ - $2^{40}$ . Resultatet er at mens der i den oprindelige prøve måske kun var ganske lidt *target*-dna til stede, har man nu fået dannet store mængder. Konsekvensen heraf er at hvis HHV-8-dna forekommer i den oprindelige prøve i mængder under detektionsgrænsen, findes det efter PCR i så store mængder at det uden videre kan påvises, fx ved dna-hybridisering.

### Materialer og metoder

#### Materialer

Ved gennemgang af arkivmateriale fandtes tre paraffinblokke

Tabel 1. Oversigt over de udvalgte herpesvirusrelaterede infektioner, omarbejdet efter Merchant (20).

Virus	Eksempler på primær infektion	Reaktivering	Reaktivering ved immuninkompetence
Herpes simplex (HSV-1, HSV-2)	Primær herpetisk gingivostomatit	Recidiverende herpes labialis og/eller genitalis	Som foregående, men med mere udtalte og langvarige manifestationer
	Herpetisk keratokonjunktivit	Recidiverende herpetisk gingivostomatit	
	Genitale infektioner »Forkølelsessår«	Recidiverende keratitis	
Varicella-Zoster virus (VZV)	Skoldkopper Asymptomatisk	Helvedesild	Som foregående, men mere alvorlige og langvarige manifestationer
Humant Cytomegalovirus (CMV)	EBV-negativ infektiøs mononukleose Sialoadenitis Høretab ved kongenit infektion Asymptomatisk	Asymptomatisk	Orale ulcerationer Retinitis Pneumoni
Epstein-Barr virus (EBV)	Asymptomatisk Infektiøs mononukleose	Asymptomatisk	Burkitts lymfom (afrikansk type) Andre maligne lymfomer Rhinopharynxcancer »Håret leukoplaki«
Humant herpesvirus 6 (HHV-6)	Asymptomatisk	Asymptomatisk	Eksantem?
	Exanthema subitum		Pneumoni?
	EBV-negativ infektiøs mononukleose		
Humant herpesvirus 7 (HHV-7)	Asymptomatisk	Roseola?	?
	Exanthema subitum?		
	Sialoadenitis?		
Humant herpesvirus 8 (HHV-8)	?	?	Kaposi sarkom Malignt lymfom

med KS fra to patienter. Der er meget sparsomme oplysninger om disse to patienter, men det fremgår at begge var hiv-positive og at den ene var fra Tanzania.

#### Metoder

**DNA-oprensning** – Formålet med dna-oprensningen er at adskille væv og paraffin samt at nedbryde dna-bindende proteiner i vævet således at dna bliver frigjort. Fra de tre paraffinblokke blev der skåret tre snit. Af én af blokkene blev desuden skåret ét ekstra snit. Snittene blev anbragt i 1,5 ml centrifugerør og tilsat 200 µl proteinase (200 µg proteinase K/ml i H<sub>2</sub>O med 0,1% Tween20). Rørene blev inkuberet ved 65 °C i to timer og efterfølgende centrifugeret kortvarigt. Herved sam-

ledes smeltet paraffin øverst og vævet nederst. Den vandige fraktion blev overført til nyt rør hvorefter proteinase K blev inaktiveret ved 100 °C i 15 min. Heraf anvendtes 3 µl til PCR. Desuden blev der fremstillet en negativ prøve, dvs. uden indhold af target dna.

**PCR for betaglobin** – Der kan i fikserede vævssnit forekomme forbindelser der virker hæmmende på den efterfølgende PCR-reaktion, ligesom dna ved fikseringen kan nedbrydes i en sådan grad at PCR ikke er muligt. For at undersøge om prøverne indeholdt dna af en kvalitet der tillod amplificering, blev der derfor foretaget PCR med primere for et 288 basepar-fragment af det humane betaglobin-gen (6), og resultatet

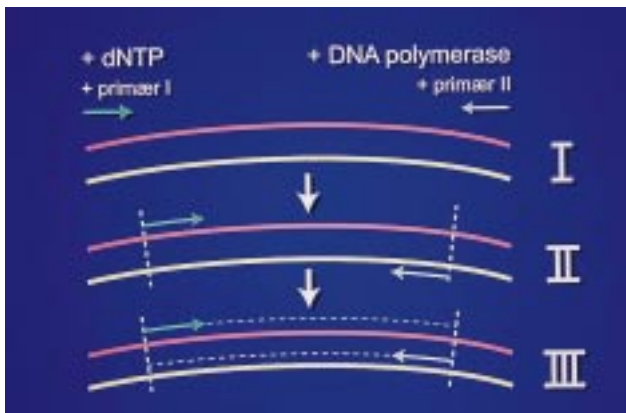


Fig. 1. Figuren illustrerer en enkelt cyklus i PCR-reaktionen. I: Ved cyklus' start findes dobbeltstrengt target dna (rød og gul), dNTP, Taq dna-polymerase samt to modsatrettede primere (grøn og hvid). II: Temperaturen er først hævet til 94°C, hvorved dobbeltstrengt dna omdannes til enkeltstrengt dna. Ved den efterfølgende afkøling til 58°C bindes (dvs. hybridiserer) de to primere til de homologe områder på hver sin HHV-8-streng. III: Ved at øge temperaturen til 72°C aktiveres dna-polymerasen og danner to nye dna-streng ud fra enkeltmukleotider i opløsningen (dNTP). Den nydannede grønne streng er homolog til den røde og dermed identisk med den gule streng – og tilsvarende er den nydannede hvide streng identisk med den røde. Udgangsmaterialet er herved fordoblet. Herefter gentages reaktionen, i alt 35 gange.

Fig. 1. The figure illustrates one PCR cycle. I: Double stranded target DNA (red, yellow), pairs of primers (green, white) as well as dNTP and Taq polymerase is present in the reaction tube. II: When the temperature is raised to 94°C the target denatures into single-stranded DNA, and when the temperature subsequently is lowered to 58°C the primers hybridize to the homologous sequences of the target DNA. III: When the temperature is raised to 72°C the DNA polymerase becomes active and synthesises two new DNA strands from single-nucleotides. The new green DNA strand is homologous with the red strand and thus identical to the yellow strand – and the produced white strand is identical to the red one. Thus, the original target DNA has been doubled. The reaction is repeated 35 times.

analyseret ved elektroforese på en 4% agarosegel (NuSieve 3:1, FMC BioProducts, DK). Efter indfarvning med ethidiumbromid kunne de amplificerede bånd ses i UV-gennemlysning.

PCR for HHV-8 – Der anvendtes de af Chang *et al.* opgivne primere: 5'-AGCCGAAAGGATTCCACCATT og 5'-TCCGTGTTGTCTACGTCAGAG der amplificerer et 233 bp dna-fragment fra HHV-8 (1). Reaktionsvolumen var i alle tilfælde 30 µl, bestående af 3 µl ekstraheret dna, 20 pmol af hver primer og 0,8 U Taq2000 polymerase (Stratagene) per

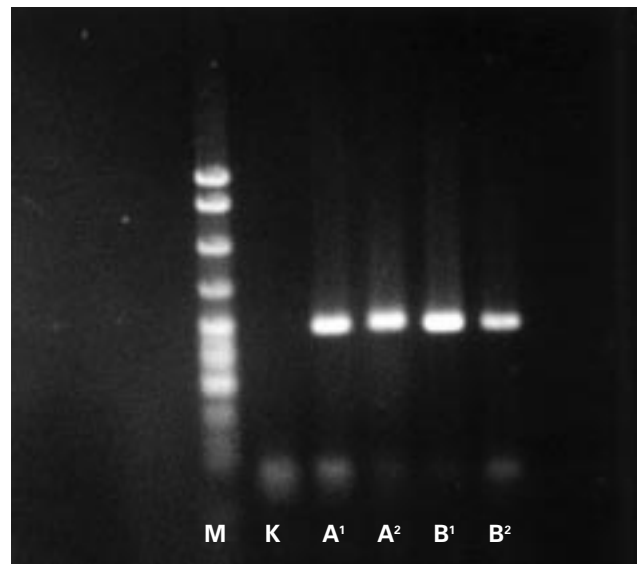


Fig. 2. Gelelektroforese af amplificeret HHV-8-dna fra tre intraorale Kaposi sarkomer fra to patienter. M: størrelsesmarkør. K: Negativ kontrol, A1 og A2: HHV-8-dna fra to intraorale Kaposi sarkomer fra samme patient. B1 og B2: HHV-8-dna fra patient nr. 1, amplificeret fra henholdsvis tre og et snit fra samme tumor. De amplificerede fragmenter svarer til ~233 basepar.

Fig. 2. Gel-electrophoresis of amplified HHV8 from three intraoral Kaposi's sarcomas in two patients. M: Size marker. K: Negative control, A1 and A2: HHV8 DNA from two intraoral Kaposi's sarcomas in the same patient. B1 and B2: HHV8 DNA from patient no. 1, amplified from three and from one tissue sections from the same tumour. The amplified DNA bands are ~233 bp.

reaktion. Desuden indeholdt PCR-blandingen KCl (50mmol/l), Tris (10 mmol/l, pH 8,5), dNTP (200 µmol/l) samt MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM). Efter et initialt denatureringsstep (95°C i tre min.) gennemførtes 35 cykler a 94°C i ét min., 58°C i ét min. og 72°C i ét min. Der blev afsluttet med 72°C i syv min.

Filterhybridisering – Ti µl af det amplificerede dna blev denatureret ved kogning, afkølet fem min. på is, hvorefter der blev tilsat 1 vol. 20xSSC (Saline+Sodium-Citrate buffer; 20xSSC er 3M NaCl, 0,3M Na-citrat, pH 7,0). To µl heraf blev »spottet« på nylonfilter (Nytran N+, Amersham).

Der blev præhybridiseret ved 55°C i én time i 5xSSC, 0,02% SDS, 0,1% N-lauroylsarcosine samt 1% Blocking Reagent (Boehringer Mannheim) og derefter hybridiseret i tre timer med en oligo probe; probens sekvens var 5'-TGCAG-CAGCTGTTGGTGTACCACATGT efter Chang *et al.* (1). Proben var indmærket med digoxigenin, idet man anvendte Boehringer Mannheim's DIG oligonucleotide tailing kit efter

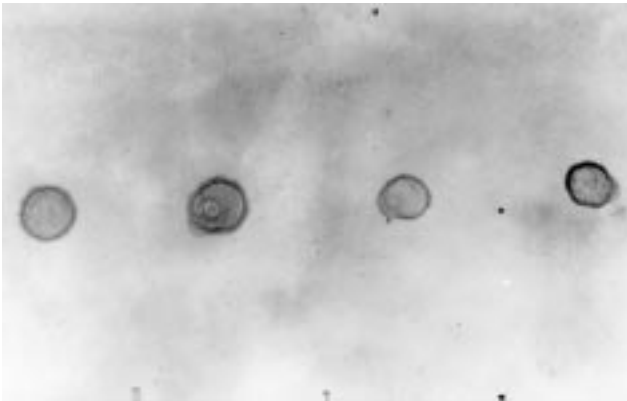


Fig. 3. Dot-blot filterhybridisering for HHV-8 af de amplificerede prøver giver tydeligvis positivt signal i alle fire tilfælde.

Fig. 3. Dot-blot filterhybridization for HHV-8 clearly reveals a positive reaction in the four samples.

producentens anvisninger. Efterfølgende blev filteret vasket i 2xSSC, 0,1% SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) (10 min.), 1xSSC, 0,1% SDS (én time), 0,1xSSC, 0,1% SDS (10 min.), inkuberet med 1:5.000 anti-DIG (Boehringer Mannheim) i 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl (pH 7,5). Dette antistof er bundet til alkalisk fosfatase. Ved tilsætning af et kromogent substrat (efter vask) for alkalisk fosfatase (NBT/X-Phosphate) vil der ved fremkaldning i mørke og under alkaliske betingelser dannes et blåsort præcipitat – forudsat at der er HHV-8-dna til stede.

## Resultater

Betaglobinfragmentet kunne amplificeres fra alle fire prøver som tegn på at prøverne var egnede til PCR. Ved PCR for HHV-8 fandtes i alle fire tilfælde et tydeligt dna-bånd på ca. 233 basepar, som indikerer tilstedeværelsen af HHV-8 i de fire prøver (Fig. 2). Dette blev endeligt bekræftet ved den efterfølgende filterhybridisering, hvor der fremkom farvereaktion for alle fire prøver (Fig. 3). Man bemærkede i øvrigt at der ved PCR ikke fandtes nogen synlig forskel mellem de prøver hvor der anvendtes tre snit, og den prøve hvor der blev amplificeret ud fra ét snit. Dette opfatter vi som et udtryk for teknikens ekstreme følsomhed.

## Diskussion

Vort fund af HHV-8 i orale KS bekræfter andres resultater. Fundet af et nyt virus hos aids-patienter rejser en del spørgsmål, først og fremmest om HHV-8 er en ætiologisk faktor ved KS og visse maligne lymfomer, dvs. om der er tale om et onkogen virus (7), samt i hvilken udstrækning dette hidtil

upåagtede virus kan findes hos hiv-negative personer, og hvilke sygdomme det i øvrigt kan relateres til.

Hos hiv-positive patienter er HHV-8 fundet i saliva (8), i blod (9, 10) og i orale aftøse ulcerationer (11), i maligne »body cavity based« B-celle-lymfomer (12) og i bronkialt skyllevand (13), foruden i oralt KS (14, 15).

Hos hiv-negative patienter er HHV-8 påvist ved benigne lymfoproliferative tilstande (16), ved klassisk KS (17) samt hos en rask bloddonor (18). I en enkelt undersøgelse er HHV-8 fundet i semen og i blod hos hiv-negative, heteroseksuelle raske personer på Sicilien (19). Den sidste undersøgelse, som foreløbigt står alene, tyder på at HHV-8 kan være vidt udbredt, men dette bør bekræftes ved andre undersøgelser.

Arbejdet er støttet af den Obelske Familiefond.

## English summary

### *Human herpesvirus type 8 in oral Kaposi's sarcomas*

Human herpesvirus type 8 (HHV-8) was initially detected in 1994 in Kaposi's sarcomas from HIV-positive patients (1). Later research, however, has shown that HHV-8 DNA also is present in the majority of Kaposi's sarcomas in non-HIV patients. In addition, HHV-8 has been detected in HIV-negative and heterosexual individuals in Sicily (19). Thus, the epidemiology of HHV-8 infections has not yet been sufficiently elucidated. In the present paper HHV-8 is demonstrated in four samples from three intraoral Kaposi's sarcomas in two HIV-positive patients. The methods employed is PCR (Fig. 2) and subsequent Dot-Blot filter hybridization (Fig. 3).

## Litteratur

1. Chang Y, Cesarman E, Pessin M, Lee F, Culpepper J, Knowles D, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma (KS). *Science* 1994; 266: 1865-9.
2. Moore P, Chang Y. Detection of herpesvirus-like DNA sequences in Kaposi's sarcoma in patients with and those without HIV infection. *N Eng J Med* 1995; 332: 1181-5.
3. <http://life.anu.edu.au80/viruses/CTVdB/31000000.htm>
4. Gillison M, Ambinder R. Human herpesvirus-8. *Curr Opin Oncol* 1997; 9: 440-9.
5. Lindeberg H. Påvisning af humant papillomvirus. Anvendt molekylær patologi. *Tandlægebladet* 1997; 101: 186-91.
6. Saiki R, Scharf S, Faloona F, Mullis K, Horn G, Erlich H, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analyses for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-4.
7. Benfield T. Humant herpesvirus 8. Et Kaposi's sarkom-associeret herpesvirus? *Ugeskr Læger* 1997; 159: 4837-8.
8. Koelle D, Huang M, Chandran B, Vieira J, Piepkorn M, Corey L. Frequent detection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) DNA in saliva of human immunodeficien-

- cy virus-infected men: clinical and immunologic correlates. *J Infect Dis* 1997; 176: 94-102.
9. Smith M, Bloomer C, Horvat R, Goldstein E, Casparian J, Chandran B. Detection of human herpesvirus 8 DNA i Kaposi's sarcoma lesions and peripheral blood of human immunodeficiency virus-positive patients and correlation with serologic measurements. *J Infect Dis* 1997; 176: 84-93.
  10. Harrington W, Bagasra O, Sosa C, Bobroski L, Baun M, Wen X, et al. Human herpesvirus type 8 DNA sequences in cell-free plasma and mononuclear cells of Kaposi's sarcoma patients. *J Infect Dis* 1996; 174: 1101-5.
  11. Di Alberti L, Speight P, Sculy C, Zakrzewska J, Williams I, Artese L, et al. Detection of human herpesvirus-8 DNA in oral ulcer tissues of HIV-infected individuals. *Oral Dis* 1997; 3 (Suppl I): S133-S134.
  12. Cesarman E, Chang Y, Moore P, Said J, Knowles D. Kaposi's sarcoma-associated Herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N Eng J Med* 1995; 332: 1186-91.
  13. Benfield T, Dodt K, Lundgren J. Human herpes virus-8 DNA in bronchoalveolar lavage samples from patients with AIDS-associated pulmonary Kaposi's sarcoma. *Scand J Infect Dis* 1997; 29: 13-6.
  14. Flaitz C, Jin Y-T, Hicks M, Nichols C, Wang Y-W, Su I-J. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences (KSHV/HHV-8) in oral AIDS-Kaposi's sarcoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1997; 83: 259-64.
  15. DiAlberti L, Teo C, Porter S, Zakrzewska J, Scully C. Kaposi's sarcoma herpesvirus in oral Kaposi's sarcoma. *Eur J Cancer* 1996; 32B: 68-9.
  16. Chadburn A, Cesarman E, Nador R, Liu Y, Knowles D. Kaposi's sarcoma -associated herpesvirus sequences in benign lymphoid proliferations not associated with human immunodeficiency virus. *Cancer* 1997; 80: 788-97.
  17. Dupin N, Grandadam M, Calvez V, Gorin I, Aubin J, Havard S, et al. Herpesvirus-like DNA sequences in patients with Mediterranean Kaposi's sarcoma. *Lancet* 1995; 345: 761-2.
  18. Blackbourn D, Ambroziak J, Lennette E, Adams M, Ramachandran B, Levy J. Infectious human herpesvirus 8 in a healthy North American blood donor. *Lancet* 1997; 349 (9052): 609-11.
  19. Viviano E, Vitale F, Ajello F, Perna A, Villafrate M, Bonura F, et al. Human herpesvirus type 8 DNA sequences in biological samples of HIV-positive and negative individuals in Sicily. *AIDS* 1997; 11: 607-12.
  20. Merchant V. An update on the herpesviruses. *CDA J* 1996; 24: 38-46.

### Forfattere

*Gitte Gregers*, stud.odont.

Odontologisk Institut, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Aarhus Universitet

*Inge Stage*, histolaborant

Afdeling for Kæbekirurgi og Oral Patologi, Odontologisk Institut, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Aarhus Universitet

*Henning Lindeberg*, lektor i oral patologi, dr.med., ph.d.

Afdeling for Kæbekirurgi og Oral Patologi, Odontologisk Institut, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Aarhus Universitet