

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie
und Tumorimmunologie

der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

EPSTEIN BARR VIRUS SPEZIFISCHE PROTEIN- UND
MICRORNA-EXPRESSIONSPROFILE BEI PRIMÄR
CEREBRALEN PTLD

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Susanne E. K. Fink

aus Potsdam

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. R. U. Trappe

2. Prof. Dr. med. R. Schindler

3. Prof. Dr. med. P. Schlattmann

Inhalt

Inhalt.....	3
Abkürzungsverzeichnis.....	5
1. Einleitung.....	10
1.1. Transplantations-assoziierte lymphoproliferative Erkrankungen	10
1.1.1. Tumorinzidenz nach Organtransplantation und Risikofaktoren der PTLD	10
1.1.2. Klinische Charakteristika und Prognosefaktoren der PTLD	11
1.1.3. Histopathologische Klassifikation der PTLD	11
1.1.4. Pathogenese der monomorphen DLBCL-Typ PTLD.....	12
1.1.5. Therapie der PTLD.....	13
1.1.4. Primär cerebrales PTLD.....	14
1.2. Epstein-Barr Virus-Infektion und EBV-Assoziation der PTLD.....	15
1.2.1. Latente Phase	17
1.2.2. Lytische Phase.....	18
1.3. Kontrolle der Genexpression durch microRNAs	19
1.3.1. Allgemeine Grundlagen.....	19
1.3.2. MicroRNAs und Lymphome	21
1.3.3. EBV-spezifische microRNAs.....	22
1.4. Ableitung der Fragestellung, Untersuchungshypothese und Studiendesign	23
2. Methoden	25
2.1. Patientendaten	25
2.2. RNA Isolation	25
2.3. cDNA Synthese.....	26
2.4. Real-Time PCR.....	26
2.4.1. Allgemeine Grundlagen.....	26
2.4.2. Primer, Amplifikation und Quantifikation	28
2.5. MicroRNA Microarray Analyse	29
2.5.1. Allgemeine Grundlagen.....	30
2.5.2. Setting dieser Dissertation	31
2.6. Statistik.....	32
3. Ergebnisse	33
3.1. Klinische Daten	33
3.2. Virale Proteinexpression bei cerebralen und systemischen PTLD	34
3.2.1. Histologie	34

3.2.2.	Expression latenter viraler Proteine mittels Real-time PCR	35
3.2.3.	Expression lytischer Proteine mittels Real-time PCR	39
3.2.4.	Vergleich der Proteinexpression primär cerebraler und systemischer EBV-assoziierter PTLD	42
3.3.	Ergebnisse der microRNA Microarray-Analysen	43
3.3.1.	MicroRNA Expression cerebraler und systemischer PTLD	43
3.3.2.	Unhierarchisches Clustering cerebraler und systemischer PTLD	45
3.3.3.	Vergleich der microRNA Expression primär cerebraler und systemischer PTLD ...	51
3.3.4.	Vergleich der microRNA-Expression EBV-assoziierter primär cerebraler und systemischer PTLD	53
3.3.5.	Unhierarchisches Clustering EBV-spezifischer microRNAs cerebraler und systemischer PTLD	53
4.	Diskussion	57
4.1	Expression latenter und lytischer Gene	57
4.2	MicroRNA-Expression	60
4.2.1	Expression „typischer“ DLBCL-assoziierter microRNAs	61
4.2.2.	Expression EBV-spezifischer microRNAs	63
5.	Zusammenfassung	70
6.	Literaturverzeichnis	72
	Erklärung	90
	Lebenslauf	91
	Publikationsverzeichnis	92

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Aktivierte B-Zellen
AP-1	Activator Protein 1
AraC	Cytarabin
B2M	Beta-2-Microglobulin
BART	BamHI A Region Transcript
BCL-6	B-Zell Lymphoma 6 protein
BIC	B-Zell Integrations Cluster
Bim	Bcl-2-Interacting Mediator of Cell Death
BL	Burkitt Lymphom
BMP	Bone Morphogenic Protein
CD	Cluster of Differentiation
CDKN1A	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor
cDNA	Komplementäre DNA
CHOP	Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine und Prednison
c-myc	c-myc Protoonkogen
CR	Komplette Remission
CR2	Complement Rezeptor Typ 2
G-CSF	Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor
CT	Computertomographie
C _t	Schwellen-Zyklus
CTL	Cytotoxische T-Zellen
CyA	Cycosporin A

Da	Dalton
EBER	Epstein-Barr Virus-encoded small RNA
EBNA	Epstein-Barr Nuclear Antigen
EBNA-LP	EBNA-Leader Protein
EBV	Epstein-Barr-Virus
EPL	Early Passage LCL
FAS	Fatty Acid Synthase
FDR	False Discovery Rate
FK-506	Tacrolimus
FWER	Familywise Error Rate
GCB-Zellen	Germinal center B-Zellen
Gp	Glycoprotein
Gr.	Gruppe
HD	Hochdosis
HIF-1 α	Hypoxia-inducible Factor alpha
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HL	Hodgkin Lymphom
HOXA1	Homebox A1
hsa-	Homo Sapiens
i.th.	Intrathekal
IKK β	Inhibitor kinase beta Inhibitor
IL	Interleukin
ISH	in-situ-Hybridisierung

LCL	lymphoblastoide Zelllinie
LDH	Laktatdehydrogenase
LMP	Latentes Membranantigen
LT	Latenztyp
Mb	Megabasen
MHC	MajorHistocompatibility Complex
miRNA	microRNA
MMF	Mycofenolat Mofetil
m-RNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MTX	Methotrexat
MUM1	Multiple Myeloma-1
Nc-RNA	Non-coding RNA
nDLBCL	Nodales diffus großzelliges B-Zell Lymphom
NF-κB	Nuclear Factor –κB
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NPC	Nasopharyngeal-Karzinom
ns.	nicht signifikant
OS	Overall survival
P53	Protein 53
pCNS	Primär cerebral
PCR	Polymerase Kettenreaktion

PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PR	Partielle Remission
Pre-miRNA	Precursor-microRNA
Pri-miRNA	Primäre-microRNA
Pten	Phosphatase and Tensin Homolog
PTLD	Post transplant lymphoproliferative disease
PUMA	Protein p53 up-regulated Modulator of Apoptosis
R	Rituximab
RAS	Rat sarcoma
Rb	Retinoblastom
RBP-Jk	Recombining binding Protein Suppressor of Hairless
RISC	RNA-induced Silencing Complex
Rpm	Rounds per Minute
RRE	BRLF1-responsible Elemente
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SCT	Stem Cell Transplantation
SEM	Standardfehler des Mittels
SMAD5	Mothers against Decapentaplegic Homolog 5
sRNA	Small RNA
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TP53INP1	Tumor Protein 53-induced Nuclear Protein 1
VCA	Virales Capsid Antigen

VEGF Vascular Endothelial Growth Factor

WHO World Health Organization

ZNS zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Transplantations-assoziierte lymphoproliferative Erkrankungen

Die aktuelle WHO-Klassifikation definiert die transplantations-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen (PTLD) als mit einer Immundefizienz assoziierte Lymphoproliferationen, die nach Knochenmark- oder Organtransplantation auftreten und jedes Organsystem befallen können. Im Gegensatz zu den HIV-assoziierten Lymphoproliferationen ist, neben dem erworbenen Immundefizit der Patienten, die Organtransplantation das entscheidende Merkmal [4].

1.1.1. Tumorinzidenz nach Organtransplantation und Risikofaktoren der PTLD

Die Tumorinzidenz nach solider Organtransplantation beträgt ca. 7%. Am häufigsten treten mit einem Anteil von jeweils etwa 45% nicht-melanomatöse Hauttumoren und solide Tumoren auf. Die PTLD ist mit einem Anteil von ca. 10 % die dritthäufigste Neoplasie [5, 6]. Die absolute Inzidenz der PTLD beträgt ca. 0,46% bis 0,84% (5-Jahres Inzidenz) [7, 8], das relative Risiko Transplantierter eine PTLD zu entwickeln ist im Vergleich zur Gesamtbevölkerung etwa 3,5- bis 7,5-fach (Hodgkin-Lymphom bzw. NHL) erhöht [9].

Es sind verschiedene Risikofaktoren bekannt, die die Inzidenz für eine PTLD erhöhen. Einer der bedeutendsten Risikofaktoren ist eine nach der Transplantation auftretende Primärinfektion mit dem Epstein Barr Virus (*EBV*). Dies betrifft besonders häufig Kinder, die häufiger als Erwachsene zum Zeitpunkt der Transplantation noch EBV-naiv sind (Infektionsgipfel von EBV im 4. Lebensjahr, 95-prozentige Durchseuchung bis zum 30. Lebensjahr). Das Risiko von Kindern an einer PTLD zu erkranken ist um das Vierfache gegenüber dem Risiko Erwachsenen erhöht [10]. Ebenso erhöht die EBV-inkompatible Transplantation (die Transplantation eines Organs eines EBV-positiven Donors zu einem EBV naiven Empfänger) das Risiko für eine PTLD [11]. Das relative Risiko und die Inzidenz der PTLD sind ferner abhängig vom transplantierten Organ selbst. So weisen kombiniert Herz-/Lungentransplantierte ein relatives Risiko von 239,5 und eine mit 6% dreifach höhere Inzidenz als Nierentransplantierte (2%) auf, bei denen das relative Risiko mit 12,9 vergleichsweise niedrig ist [12, 13]. Die Anwendung von Immunsuppressiva wie OKT3 und ATG erhöht das Risiko für das Auftreten einer PTLD [14]. Ein erhöhtes Risiko im Zusammenhang mit einer Immunsuppression durch MMF, CyA, FK 506 oder Azathioprin wurde beschrieben, wird jedoch aufgrund widersprüchlicher Studienlage kontrovers diskutiert [15].

1.1.2. Klinische Charakteristika und Prognosefaktoren der PTLD

Dem Zeitpunkt des Auftretens der PTLD entsprechend, werden eine „frühe“ PTLD, jene, die innerhalb eines Jahres nach Transplantation auftritt, von einer „späten“ PTLD, jene die nach einem Jahr und später nach Transplantation auftritt, unterschieden. In beiden Fällen kann grundsätzlich jedes Organ durch die PTLD befallen sein, der alleinige Befall von Lymphknoten allerdings ist seltener, als der alleinige extranodale Befall [16, 17]. Zudem zeigen PTLD, die eine EBV-Assoziation aufweisen wesentlich häufiger einen Befall des transplantierten Organs (26% vs. 6%) sowie selteneren Befall von Lymphknoten (52% vs. 83%) und treten signifikant häufiger im ersten Jahr nach Transplantation auf (52% vs. 5%), als PTLD ohne EBV-Assoziation [18]. In bis zu 12% liegt bei der PTLD auch eine ZNS-Beteiligung vor [19]. Daneben gibt es Fälle primär cerebraler PTLD, die ohne gleichzeitigen Befall anderer Organsysteme auftreten. Ein Befall des ZNS ist grundsätzlich ungünstig und geht mit einer erhöhten Mortalität einher. Dementsprechend verringern sich die Einjahresüberlebensraten von 56-73% bzw. die 5-Jahres-Überlebensraten von ca. 40%-61% [20] stark, wenn eine ZNS-Beteiligung vorliegt (3-Jahres-Überlebensrate: 40%) [21]. Prognostisch ungünstig wirken sich zudem ein schlechter Allgemeinzustand, eine fehlende EBV-Assoziation des Tumors und der Befall des Transplantats, ebenso wie die allgemein für Lymphome geltenden Risikofaktoren wie Alter, hohe LDH, B-Symptomatik und Knochenmarkbefall aus [16]. Eine deutlich bessere Überlebensrate zeigen Kinder, die von einer PTLD betroffen sind, so liegt bei ihnen die Fünfjahresüberlebensrate nach Nierentransplantation bei bis zu 87,4% [22].

Aufgrund des vielfältigen extranodalen Befalls sind charakteristische oder pathognomonische Symptome der PTLD, jenseits der allgemeinen Faktoren wie Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsabnahme, bisher nicht definiert worden [23].

1.1.3. Histopathologische Klassifikation der PTLD

Die histopathologische Untersuchung einer bioptisch oder chirurgisch gewonnenen Gewebeprobe, ist wesentlich für die Diagnose einer PTLD. Neben immunhistochemischen Färbungen zur Feststellung der Linienzugehörigkeit dienen hier spezielle molekularbiologische Untersuchungen wie die EBER in situ Hybridisierung bzw. die B- und T-Zell-Rezeptoranalyse dem Nachweis einer EBV-Assoziation bzw. dem Klonalitätsnachweis. Die Klassifikation der PTLD umfasst insgesamt vier Hauptgruppen, die weiter in Untergruppen untergliedert werden. Dabei reicht das Spektrum der Lymphoproliferation von sog. „frühen“ Läsionen, die histologisch dem Zellbild einer infektiösen Mononukleose ähneln (polyklonal), über polymorphe Lymphoproliferationen (polyklonale und monoklonale Erkrankungen) bis hin zu monomorphen (häufig monoklonalen, gelegentlich auch oligoklonalen) Lymphoproliferationen. Die

monomorphe PTLD wird entsprechend der WHO-Klassifikation der B- und T-Zell-Lymphome weiter untergliedert. Der häufigste Subtyp der monomorphen B-Zell PTLD ist dabei das diffus grosszellige B-Zell Lymphom (*DLBCL*). Noch einmal speziell abgegrenzt wird die Hodgkin- oder Hodgkin-ähnliche PTLD (siehe Abbildung 1).

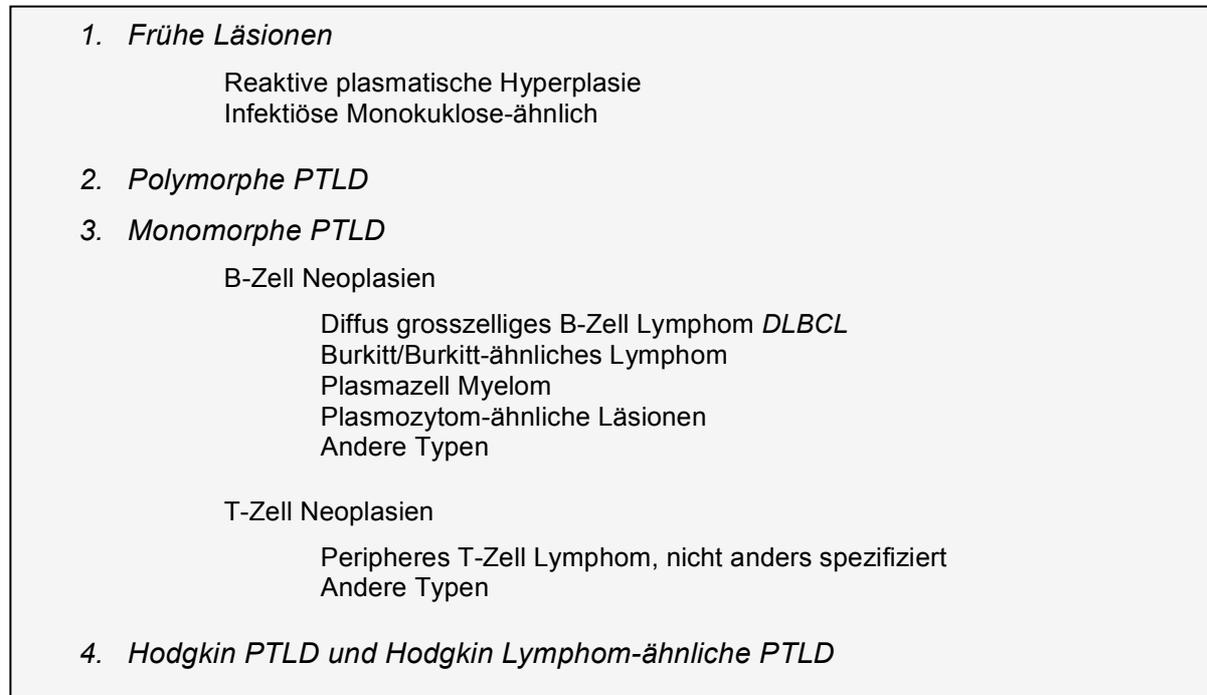


Abbildung 1. Klassifikation des Posttransplantationslymphoms anhand histologischer Aspekte in vier Hauptgruppen und deren Untergruppen.

Während die „early lesion“ PTLD und auch die polymorphe PTLD eine relativ enge EBV-Assoziation aufweisen, ist die monomorphe PTLD nur in etwa 40-50% der Fälle mit dem Epstein-Barr-Virus assoziiert.

1.1.4. Pathogenese der monomorphen DLBCL-Typ PTLD

Das DLBCL ist histomorphologisch durch eine nodale Struktur mit großen, transformierten Blasten mit prominenten Nukleolen und basophiles Zytoplasma gekennzeichnet. Diese blastären Zellen stammen entweder von B-Zellen ab, die die Keimzentrumsreaktion durchlaufen haben (sog. Germinal Center B-Zellen: GCB-Zellen) und entsprechend somatische Hypermutationen von Teilen des B-Zell Rezeptors (*BCR*) aufweisen. Zum anderen können sie in-vitro aktivierten B-Zellen entsprechen (ABC-Typ). Ist eine Zuordnung zu keinem der beiden Typen möglich, wird von einem nonGCB-non-ABC-Typ gesprochen [24]. Der GCB- und ABC-Typ sind durch ein spezifisches Expressionsprofil definiert, können aber mit Einschränkung auch immunhistochemisch anhand der CD10-, BCL6- und MUM1-Expression bestimmt werden (Hans-Klassifikation) [25]. Auch andere Algorithmen der histologischen Typen-Zuordnung

existieren, keiner dieser ist jedoch so präzise, wie die Bestimmung des Genexpressionsprofils selbst [26].

Die Herkunft der entarteten B-Zellen eines DLBCL bestimmt zum Teil auch die Prognose der Patienten, wobei DLBCL vom ABC-Typ prognostisch ungünstigere Verläufe aufweisen [24].

Trotzdessen der Ursprung der entarteten B-Zelle beim DLBCL bestimmt werden kann, sind die zur Mutation der B-Zelle führenden Einzelschritte der malignen Transformation nicht vollständig verstanden, allerdings konnten viele Teilaspekte identifiziert werden. Teil der Pathogenese der DLBCL-Typ PTLD kann dabei auch die EBV-Infektion sein. Der Progress zu einer monoklonalen Lymphoproliferation jedoch erfordert zusätzliche genetische Alterationen, insbesondere da 50% der Fälle nicht EBV-assoziiert sind. Ausgehend von der oben diskutierten „Ausgangszelle“ des DLBCL (GCB, ABC, nonGCB-ABC) ist grundsätzlich auch beim DLBCL-PTLD anzunehmend, dass es während des Durchlaufens der Keimzentrumsreaktion zu genetischen und/oder epigenetischen Veränderungen der zellulären DNA kommen könnte, was eine unkontrollierte monoklonale Proliferation zur Folge haben kann. Mutationen von BCL-6, c-myc und p53, sowie aberrante somatischen Hypermuationen und DNA- Hypermethylierungen sind hier beim klassischen DLBCL häufige Veränderungen [27, 28]. Trotz der relativ einheitlichen Histomorphologie des DLBCL sind die genetischen Unterschiede aber bekanntermaßen umfangreich. Die EBV-Assoziation der PTLD wird die Diversität möglicherweise weiter erhöhen. Auch sind Unterschiede in der Art und pathogenetischen Bedeutung der EBV-Assoziation bei verschiedenen Fällen EBV-assoziiierter DLBCL-Typ PTLD denkbar.

1.1.5. Therapie der PTLD

Eine Reduktion der Immunsuppression ist wesentlicher Bestandteil jeder PTLD-Therapie und erfolgt meistens direkt nach Diagnosestellung, angepasst an das Abstoßungsrisiko des transplantierten Organs. Bereits die alleinige Reduktion der Immunsuppression kann zu einem Ansprechen führen [23]. Die vielen retrospektiven Serien, die den Stellenwert einer Reduktion der Immunsuppression bei PTLD beschreiben, haben die Ansprechrate auf diese Maßnahme jedoch überschätzt, was durch eine erste prospektive Studie bei monomorpher PTLD deutlich wird, die eine Ansprechrate von lediglich 6% zeigt [29]. Die Monotherapie mit Rituximab, einem B-Zell-Antikörper gegen das Oberflächenantigen *CD20*, zeigte in drei prospektiven Phase II-Studien Ansprechraten zwischen 45 und 65%, aber nur in 20% ein komplettes Ansprechen (complete response *CR*) [17]. Als vorteilhaft gilt die geringe Rate an Nebenwirkungen [30]. Ein weiterer Therapieansatz, der hohe Ansprechraten zeigt, ist die Chemotherapie nach dem CHOP Schema (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison). Diese ist jedoch mit

einer hohen therapieassoziierten Mortalität von bis zu 31% verbunden [31]. Die sequentielle Immunochemotherapie mit 4 wöchentlichen Gaben von Rituximab, gefolgt von 4 dreiwöchentlichen Zyklen einer Chemotherapie mit CHOP+G-CSF (Granulozytenkolonie stimulierender Faktor) konnte die Chemotherapie-assoziierte Mortalität verringern, und das Langzeitüberleben der Patienten gegenüber der Rituximab Monotherapie weiter verbessern. Mit einer Ansprechrates von 90% gilt dieses Therapieschema in vielen Zentren derzeit als Therapiestandard für alle Patienten, die mit einer Reduktion der Immunsuppression allein nicht ausreichend behandelt sind [17].

Bei limitiertem Befall durch die PTLD, können neben einer Reduktion der Immunsuppression auch allein chirurgische oder strahlentherapeutische Maßnahmen erwogen werden.

1.1.4. Primär cerebrales PTLD

Als primär cerebrales Posttransplantationslymphom (pCNS-PTLD) wird jedes nach einer Organ- oder Knochenmarktransplantation auftretende Lymphom, mit ausschließlicher Lokalisation im zentralen Nervensystem und ohne Nachweis eines systemischen Befalls bezeichnet.

Obwohl ein extranodaler Befall bei der PTLD häufig vorkommt, ist eine primär zerebrale Lokalisation sehr selten und wird bei nur ca. 0.3% aller transplantierten Patienten beobachtet [32]. Die Diagnose des pCNS-PTLD erfolgt durchschnittlich 18 bis 52 Monaten nach Transplantation. Ein signifikant späteres Auftreten wurde bei Patienten beobachtet, deren immunsuppressives Regime von Azathioprin (AZT) auf Mycophenolat Mofetil (MMF) umgestellt wurde (80 Monate vs. 15 Monate) [33]. Eine erste retrospektive Auswertung von 159 Patienten mit primär cerebralem PTLD wurde von *Penn et. Porat* publiziert [19]. Wenige Fallbeschreibungen [34-36] gingen einer weiteren, im Jahre 2000 veröffentlichten und 8 Patienten umfassenden, Patientenserie voraus [32]. Drei weitere retrospektive Studien folgten, in denen insgesamt 71 Patienten über einen Zeitraum von 30 Jahren beschrieben wurden [33, 37, 38].

Aufgrund des Befalls des zentralen Nervensystems ist die klinische Symptomatik gelegentlich durch fokale neurologische Störungen, Kopfschmerz, Lethargie und/oder Persönlichkeitsänderungen gekennzeichnet. Die Diagnosestellung erfolgt durch Schnittbildgebung und nachfolgende stereotaktische Biopsie. Bei Verwendung von Kontrastmitteln, stellen sich die Läsionen häufig ringförmig und zentral nekrotisch oder aber homogen dar. Differentialdiagnostisch müssen vor allem eine Infektion und ein Glioblastom in Betracht gezogen werden. Meistenteils sind die Läsionen supratentoriell gelegen, Einzelläsionen treten seltener auf als multifokale Läsionen.

Histologisch zeigt sich ein Überwiegen von PTLDs der B-Zellreihe, speziell der DLCBL-Typ PTLD. Vereinzelt werden aber auch polymorphe PTLD und T-Zell-PTLD beschrieben [33, 37, 38]. Im Gegensatz zu primären ZNS-Lymphomen immunkompetenter Patienten, aber auch im Gegensatz zu den nicht ausschließlich auf das ZNS begrenzten DLBCL-Typ PTLD, zeigt das pCNS PTLD eine sehr hohe EBV-Assoziation (etwa 90% der Fälle) [38].

Die Therapie des pCNS PTLD weist einige Besonderheiten auf. Neben der Reduktion der Immunsuppression ist vor allem eine Hochdosischemotherapie mit Methotrexat ein wesentlicher Therapiebestandteil, aber auch der systemischen Gabe von Rituximab und der Ganzhirnbestrahlung kommen eine wichtige Bedeutung zu [39]. Eine chirurgische Resektion ist nur bei lokalisiertem Befall, zur diagnostischen Sicherung oder bei Anzeichen von Hirndruck indiziert. Das mediane Überleben schwankt zwischen 13 Wochen und 47 Monaten, die Einjahresüberlebenschance liegt in einigen Studien bei bis zu 64%, die Zweijahresüberlebenschance bei 34% [33, 37].

1.2. Epstein-Barr Virus-Infektion und EBV-Assoziation der PTLD

Vor etwas mehr als 40 Jahren wurde das Epstein-Barr-Virus entdeckt, M.A. Epstein, B.G. Achong und Y.M. Barr isolierten es aus Tumorzellen des Burkitt-Lymphoms afrikanischer Kinder [40].

Das Epstein-Barr Virus gehört der Familie der Gamma-Herpes Viren an. Sein Genom besteht aus doppelsträngiger DNS, die von einem ikosaedrischen Capsid umgeben wird. Die Hülle des Virus besteht u.a. aus Glycoproteinen, die seine Anheftung und Fusion mit der Wirtszelle ermöglichen. Das Epstein-Barr Virus ist ein stark, aber nicht ausschließlich, lymphotropes Virus, welches neben B-Lymphozyten auch Makrophagen, T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen, Epithelzellen und glatte Muskelzellen infiziert. Neben der PTLD wird das Epstein-Barr-Virus mit dem Burkitt Lymphom, dem Nasopharyngealkarzinom, dem Hodgkin Lymphom, dem T/NK-Zell Lymphom, Magenkarzinomen, HIV-assoziiertem Non-Hodgkin-Lymphomen und dem Leiomyosarkom in Verbindung gebracht [41].

Das Epstein-Barr-Virus wird durch Speichel übertragen und befällt primär die Epithelzellen des Oropharynx, anschließend dann die B-Lymphozyten. Ermöglicht wird dies durch die Interaktion des viralen Glycoprotein *Gp350/220* mit dem CD21 Rezeptor der Epithelzellen/B-Lymphozyten [42]. Eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus kann asymptomatisch verlaufen, aber auch das Krankheitsbild der infektiösen Mononukleose hervorrufen. Der Infektionsgipfel liegt im Kindes-/Jugendalter. Bis zum 30. Lebensjahr sind in Europa 95% der Population mit EBV infiziert.

Die initiale Infektion durch das Epstein-Barr-Virus ruft eine humorale Immunantwort hervor, die durch eine Antikörperproduktion gegen latente und lytische Proteine des EBV (anti-EBNA1, anti-gp350, anti-VCA) gekennzeichnet ist. Die Immunabwehr von EBV ist im wesentlichen aber T-Zell-vermittelt. Den EBV-spezifischen, CD8-positiven zytotoxischen T-Lymphozyten (*CTL*) kommt hier eine zentrale Bedeutung zu. Ihre Anzahl nimmt im Verlauf der akuten Infektion deutlich zu wobei sich bis zu 50% dieser spezifischen T-Zellen gegen lytische Antigene des EBV richten [43].

Trotz einer suffizienten Immunantwort und der Elimination einer Vielzahl von EBV-infizierten B-Zellen, gelingt es dem Virus in einigen Wirtszellen, speziell den Gedächtnis B-Lymphozyten, zu persistieren. Innerhalb dieser Zellen liegt das Virus dann als sogenanntes Episom vor, ohne dass eine nachweisbare virale Proteinbiosynthese stattfindet. Aus diesem Zustand der minimalen Latenz heraus kann das Virus reaktivieren, was dann zum Durchlaufen eines lytischen und eventuell eines replikativen Zyklus führt und durch die Expression charakteristischer viraler Proteine gekennzeichnet ist (siehe unten). Diese Proteine werden intrazellulär durch die infizierte Zelle prozessiert und anschließend auf der Zelloberfläche im MHC-Kontext präsentiert, wo sie durch EBV-spezifische T-Zellen erkannt werden können, was die Lyse der Wirtszelle nach sich zieht.

Um einer vollständigen Elimination durch das Immunsystem während der latenten oder lytischen Phase zu umgehen, hat das Virus spezielle Strategien entwickelt. So ist u.a. die Expression latenter Proteine auf ein Minimum reduziert (z.T. nur eine m-RNA Kopie pro infizierter Zelle). Zusätzlich kann die Antigenpräsentation viraler Proteine über MHC-Moleküle der Wirtszelle verhindert werden [44]. Dem immunkompetenten Menschen gelingt es, eine Immunantwort zu generieren, die zwar nicht ausreichend ist, eine Persistenz des Virus zu verhindern, aber Krankheitssymptome und eine maligne Transformation der infizierten Zellen weitgehend verhindert.

Wie EBV zur malignen Transformation beiträgt, ist nicht vollständig geklärt. Sicher ist, dass in einer Umgebung, in der eine Immunantwort durch T-Lymphozyten fehlt, die Infektion von B-Lymphozyten mit EBV zu deren Immortalisierung und zur Entstehung einer sogenannten lymphoblastoiden Zelllinie (*LCL*) führt [45]. Die ungehemmte Proliferation wird dabei durch die Interaktion EBV-spezifischer Latenzproteine mit Cyclinen und Tumorsuppressoren wie z.B. dem Retinoblastom-Protein erreicht. Daneben werden antiapoptotische Prozesse aktiviert und die Entstehung einer polyklonalen Lymphoproliferation begünstigt. Da unter immunsuppressiven Bedingungen auch in vivo die Immunantwort gegen lytische und latente Virusantigene abgeschwächt ist, wird für die Entstehung der PTLD ein vergleichbarer Mechanismus angenommen.

1.2.1. Latente Phase

In der latenten Phase findet keine Virusreplikation statt, das Virus exprimiert lediglich bis zu maximal neun, als latent bezeichnete, Proteine, die nukleären Epstein-Barr Virus Antigene *EBNA1*, *EBNA2*, *EBNA3A*, *EBNA3B*, *EBNA3C*, das EBNA leader Protein (*EBNA-LP*), die latenten Membranproteine *LMP1*, *LMP2A* und *LMP2B* sowie die beiden Epstein-Barr virus-encoded small RNAs *EBER1* und *EBER2* und Transkripte der BamHI A Region (*BARTs*). Die Beobachtung, dass nicht immer das gesamte Repertoire dieser Proteine exprimiert wird, hat zur Definition und Unterscheidung von drei Latenztypen geführt. Die PTLD ist mit verschiedenen Latenztypen (0 bis III, Tabelle 1), am häufigsten aber mit dem Latenztyp III assoziiert.

Latenz	EBNA-1	EBNA-2	LMP-1	LMP-2	EBER	BARTs	Erkrankung
I	+	-	-	-	+	+	Burkitt Lymphom Burkitt-PTLD
II	+	-	+	+	+	+	Hodgkin Lymphom Nasopharyngeal Karzinom T/NK Lymphom Peripheres T-Zell Lymphom Magenkarzinom Primäres Effusions-Lymphom Hodgkin-PTLD
III	+	+	+	+	+	+	HIV-assoziiertes DLBCL Infektiöse Mononukleose Chronisch aktive EBV Infektion X-linked lymphoproliferative Erkrankung Early lesion PTLD, polymorphes PTLD und alle Subtypen der monomorphen PTLD Lymphomatoide Granulomatose Leiomyosarkom
0	-	-	-	-	+		Monomorphe PTLD

Tabelle 1. Darstellung der Latenztypen, die den jeweiligen Latenztypen definierenden Transkripte und die für den Latenztypen typischen Erkrankungen. In Anlehnung an [3].

LMP1: Für die Transformation der B-Zelle ist die Expression des LMP1 von entscheidender Bedeutung. Das transmembrane Protein ist Mitglied der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie *TNFR* und aktiviert über die cytoplasmatische Seite die NF- κ B Signalkaskade, wodurch Zellwachstum und Differenzierung gefördert werden [46, 47]. Als eine Art virales Mimikry ähnelt LMP1 damit dem B-Zell-eigenen Rezeptor CD40, über den T-Helferzellen die Apoptose einer B-Zelle verhindern und damit deren Überleben, Wachstum und Differenzierung stimuliert können [48, 49]. LMP1 steigert die Expression des antiapoptotischen BCL-2 und stimuliert die IL-6 und IL-8 Expression [50]. Die fehlende Expression von LMP1 in B-

Lymphozyten führt zu fehlender Transformation dieser Zellen *in vitro* [51], die Transfektion von Fibroblasten mit LMP1 befähigt diese zur Ausbildung von Tumoren *in vivo* [52].

EBNA2: EBNA2 ist unabdingbar für die B-Zell Immortalisierung, denn EBNA2 missende EBV Stränge können diese nicht initiieren [53]. EBNA2 ist zudem ein Transkriptionsfaktor und kann als dieser die Expression von LMP1 und LMP2 induzieren [54]. Diese und andere Funktionen des EBNA2 können durch ein virales Mimikry des zellulären NOTCH Signalweg vermittelt werden. Daneben können zelluläre Gene aktiviert werden, z.B. das B-Zell-Oberflächenprotein CD23, welches Überleben und Wachstum vermittelt [55]. Das latente Proteine EBNA-LP koaktiviert EBNA2 und fördert insbesondere die Expression von LMP1 [56].

1.2.2. Lytische Phase

Während der latenten Infektion der B-Zelle durch das Epstein-Barr Virus, findet keine Vermehrung des Virus in der B-Zelle selbst statt. Der Übergang in eine Phase, in der dies geschehen kann, ist möglich und wird als Phase der lytischen Replikation von EBV bezeichnet.

Eingeleitet werden kann die lytische Replikation durch verschiedenste Stimuli, unter anderem durch eine B-Zell-Rezeptor-Aktivierung. Hierdurch erfolgt die Aktivierung bestimmter Promotoren, die auch eine gesteigerte Genexpression lytischer EBV-Proteine ermöglicht. Während des Durchlaufens der lytischen Phase werden aufeinander folgend verschiedene Gene aktiviert, die als i) „immediate early lytic genes“ ii) „early lytic genes“ und iii) „late lytic genes“ bezeichnet werden. Dabei umfasst die Gruppe der „immediate early lytic genes“ Gene, deren Genprodukte für die Initiierung der Replikation erforderlich sind. Die dann folgende Aktivierung der „early lytic genes“ führt zur Expression von Proteinen, die für die eigentliche Replikation des Virus erforderlich sind, wie z.B. die virale DNA Polymerase. Gene, deren Genprodukte zur Produktion von Strukturproteinen des Virus notwendig sind, gehören den „late lytic genes“ an. Auf einige Proteine der genannten Gene soll im Folgenden detaillierter eingegangen werden.

1.2.2.1. Immediate early und late lytic genes

Am Beginn der lytischen Virusreplikation steht die vermehrte Expression der Gene BZLF1 und BRLF1. Deren Produkte sind die Proteine Z, R und eine Spleißvariante aus beiden Genen: RAZ.

Der gesteigerten Expression dieser Gene geht die Aktivierung ihrer Promotoren, Zp und Rp, voraus. Dies erfolgt über die Bindung verschiedener Proteine an die Sequenzmotive von Zp und Rp. Wichtig hierbei ist, dass sich die beiden Proteine BZLF1 und BRLF1 selbst und gegenseitig

über ihre Promotoren in ihrer Expression stimulieren. Die Aktivierung des Rp führt sowohl zur Transkription von R, Z und RAZ, die Zp Aktivierung hingegen führt nur zur Transkription von Z.

BZLF1: Das Protein BZLF1, auch ZEBRA, Zta oder Z genannt, ist für die Einleitung der lytischen Replikation unabdingbar. Über die sogenannten Z-responsiblen Elemente (*ZRE*) bestimmter DNA Abschnitte, kann BZLF1 die Transkription von BRLF1, frühen und lytischen Genen initiieren. Zellen, die kein BZLF1 exprimieren, können den Zyklus der lytischen Replikation nicht durchlaufen [57]. BZLF1 hat als Homolog des zellulären Transkriptionsfaktors *AP-1* auch Einfluss auf die zelluläre Genexpression und führt zur vermehrten Transkription von Interleukin 10 (*IL-10*) [58, 59]. Außerdem ist BZLF1 in der Lage, die proapoptischen Effekte von *p53* zu inhibieren und einen Zellzyklusarrest herbeizuführen [60-62].

BRLF1: Auch das Protein BRLF1 ist ein Transkriptionsfaktor und für die Aktivierung und das Durchlaufen des lytischen Zyklus unabdingbar. BRLF1 bindet über BRLF1-responsible Elemente (*RRE*) an Abschnitte der DNA verschiedener Promotoren unter anderem der frühen lytischen Gene. In Zellen, in denen BRLF1 nicht exprimiert wird, findet keine lytische Replikation statt, da BZLF1 nicht aktiviert werden kann. Trotzdem können in diesen Zellen späte lytische Gene und deren Proteine exprimiert werden [57]. Auf zellulärer Ebene führt BRLF1 zur Aktivierung der Fatty Acid Synthase und von c-met, einer Rezeptor-Thyrosinkinase, welche u.a. NF- κ B aktivieren kann und antiapoptische Effekte vermittelt [63, 64].

BLLF1: Das Produkt des Gens BLLF1 ist ein stark glykosyliertes Hüllprotein, welches in zwei alternativen Spleißformen mit einer resultierenden Masse von 350 und 220 kDa vorkommt und deshalb als Gp350/220 bezeichnet wird. Es vermittelt die Anheftung des Epstein-Barr Virus an die B-Zelle über eine Interaktion mit dem B-Zell Complement Rezeptor Typ 2 (CR2 oder CD21) [42].

1.3. Kontrolle der Genexpression durch microRNAs

1.3.1. Allgemeine Grundlagen

Die DNA des Menschen umfasst etwa 3 Milliarden Basenpaare, die für ca. 20000-25000 Gene kodieren. Diese kodierenden Sequenzen machen aber nur 2-3 % (etwa 90 Mb) des humanen Genoms aus. Neben kodierende Ribonukleinsäure (mRNA) werden auch eine Reihe nicht-kodierender DNA-Abschnitte transkribiert woraus ein Pool verschiedener ncRNAs resultiert.

Die nicht-kodierenden RNAs lassen sich anhand ihrer Größe und Funktion in ribosomale RNAs (rRNA), transfer RNAs (tRNA), small nuclear RNAs (smRNA), small nucleolar RNAs (snRNA)

und small RNAs (sRNA) differenzieren. Die Gruppe der sRNAs umfasst dabei weiter die sechs Typen: tiny-noncoding RNA, small interfering RNA, small modulatory RNAs, PIWI (P-element-induced wimpy testis)-interacting RNAs und schließlich auch die microRNAs (miRNA). Allen sRNAs gemeinsam ist, dass ihre Länge nicht mehr als 21-35 Nukleotide beträgt.

Die mature microRNA besteht aus 19-25 Nukleotiden, die sich von Introns oder Exons kodierender wie nicht-kodierender Gene ableiten. Die Transkription der entsprechenden Genabschnitte erfolgt durch die Polymerase II bzw. III und führt zu einem bis zu 1000 Bp langen Transkript, welches als primäre miRNA *pri-miRNA* bezeichnet wird. Im Zellkern wird diese primäre miRNA dann durch eine Endonuklease gespalten, was die ca. 60-70 Nukleotide umfassende precursor miRNA *pre-miRNA* freisetzt, die typischer Weise eine Schleife aufweist. Die *pre-miRNA* wird dann aus dem Nukleus der Zelle in das Zytoplasma überführt, wo durch eine weitere Endonuklease die Schleife entfernt wird. Es entsteht so ein transientes miRNA:miRNA-Duplex, welches durch eine Helikase aufgetrennt wird und wodurch schließlich die einzelsträngige mature microRNA freigegeben wird [65].

Die Nomenklatur der microRNAs kennzeichnet deren Herkunft (Präfix *hsa-* für homo sapiens, *ebv-* für vom Epstein-Barr Virus stammende microRNAs), ferner ihre individuelle Nummer (z.B. *hsa-miR-115*). Unterscheiden sich verschiedene microRNAs nur in einem einzigen Nukleotid wird dies durch den Suffix kenntlich gemacht (z.B. *hsa-miR-30a* und *hsa-miR-30b*). Sind verschiedene microRNAs sequenzidentisch, gehen aber aus verschiedenen *pri-miRNAs* hervor, wird dies durch eine weitere Zahl als Suffix kenntlich gemacht (z.B. *hsa-miR-21-1* und *hsa-miR-21-2*). Existieren mature miRNAs sowohl vom 5'-Ende als auch vom 3'-Ende der *pri-miRNA* wird dies durch das Suffix -5p oder -3p gekennzeichnet [66]. Derzeit sind 1425 humane miRNAs bekannt [67].

Es wird angenommen, dass ein Drittel aller menschlichen Gene Zielstrukturen unterschiedlichster miRNAs sind [68]. Die besondere Bedeutung der miRNAs liegt dabei in ihrer Fähigkeit, die Expression von Genen posttranskriptional zu regulieren. Dies kann auf zweierlei Wegen geschehen, zum einen durch das Zerschneiden der mRNA und zum anderen durch translationale Repression. Beide Mechanismen erfordern eine Interaktion zwischen der jeweiligen microRNA und dem sogenannten RNA-induced silencing Complex (*RISC*) einerseits und der Ziel-mRNA andererseits. Ob es schließlich zur Degradation der mRNA oder zur Suppression der Translation kommt, wird durch den Grad der Komplementarität zwischen mRNA und miRNA bedingt. Ist die microRNA nahezu vollständig komplementär zur Ziel-mRNA folgt die Degradation durch die Endonukleaseaktivität von *RISC*. Die microRNA bleibt hierbei intakt und kann daher die Degradation weiterer mRNA-Transkripte des jeweiligen Gens bewirken. Ist die microRNA nur wenig, aber ausreichend komplementär, wird die Translation

der Ziel-mRNA unterbunden. Auch dies geschieht in Zusammenspiel mit dem RISC [69]. Neuere Arbeiten zeigen jedoch auch, dass microRNAs zu einer posttranskriptionalen Hochregulation und damit posttranskriptional gesteigerten Genexpression führen können [70].

1.3.2. MicroRNAs und Lymphome

MicroRNAs, als Teilaspekt der Expressionskontrolle, sind in Prozesse wie Stammzellendifferenzierung, Organentwicklung und Apoptosekontrolle involviert und spielen daher auch eine Rolle in der Krankheits- und Malignomentwicklung. Da microRNAs z.B. gewebs- oder/und entwicklungsstadienspezifisch exprimiert werden, können sie auch zur Charakterisierung verschiedener Gewebetypen genutzt werden.

Der Frage, welche Rolle jede einzelne microRNA in Bezug auf hämatologische Erkrankungen einnimmt, ging die Charakterisierung des microRNA Expressionsmusters gesunder hämatopoetischer Zellen voraus. Dies geschah durch die Gruppe Chen *et al.* im Jahre 2004 [71]. Es folgten Untersuchungen zur Veränderung des Expressionsmusters während des Durchlaufens der normalen Entwicklung der hämatopoetischen Zelle. Die gewonnenen Erkenntnisse ermöglichten den Vergleich zum jeweilig anormalen Konterpart. Die Identifikation der regulierten Ziel-mRNAs und damit die Identifikation der zur Tumorgenese beitragenden und durch microRNAs beeinflussten Signalwege in einer definierten Entität sind ebenso Ziel vieler Untersuchungen, wie die Identifikation von Prognosefaktoren.

1.3.2.1. MicroRNA-Analysen bei PTLD

Bisher nahezu unerforscht ist die microRNA-Expression in transplantations-assoziierten Lymphoproliferationen. Ein einziger Artikel wird unter diesen Suchkriterien in PubMed angezeigt. Kluvier *et al.* beschreiben hierin eine gesteigerte Expression der hsa-miR-155 in 11 Fällen eines EBV-assoziierten B-Zell-PTLD [72]. Hinzu kommen nur die bisher unveröffentlichten Ergebnisse der Gruppe Gandhi *et al.*, die die EBV spezifische microRNA-Expression von Lymphomen immunkompetenter Patienten (hier BL, HL, NPC) mit denen immuninkompetenter Patienten (hier polymorphe PTLD, DLBCL-PTLD) verglichen. Im Ergebnis zeigte die Auswertung des globalen EBV-microRNA-Expressionsmusters keinen Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen. Jedoch konnte gezeigt werden, dass, bei Beschränkung des Vergleichs auf EBV-assoziierte DLBCL vs. DLBCL-PTLD und polymorphe PTLD, insgesamt 13 EBV-microRNAs unterschiedlich exprimiert werden.

1.3.2.2. MicroRNA-Expressionsanalysen „klassischer“ DLBCL

Entgegen der weitgehend fehlenden Analysen von microRNAs bei PTLD, sind Untersuchungen zur microRNA Expression in diffus großzelligen B-Zell Lymphomen der Immunkompetenten häufig durchgeführt worden.

Die ersten Untersuchungen bei DLBCL erfolgten im Jahr 2005 durch die Gruppe von *Kluvier et al.*, die beschrieben, dass sich das DLBCL durch eine signifikant höhere Expression der hsa-miR-155 deutlich von normalen B-Zellen unterscheidet [73]. Nachfolgende Studien haben zur Identifikation weiterer microRNAs geführt, deren Expression im DLBCL gesteigert sind. Dies sind insbesondere die microRNAs hsa-miR-155, hsa-miR-15a, hsa-miR-21, hsa-miR-222 und hsa-miR-17-92.

Die Einteilung des DLBCL in einen ABC- und GCB-Typ (siehe oben) hat in der Untersuchung der microRNA-Expressionsmuster einen neuen Schwerpunkt definiert. *Lawrie et al.* fanden eine in ABC-Zelllinien signifikant höhere Expression von hsa-miR-155, hsa-miR-21 und hsa-miR-221 im Vergleich zu GCB-Zelllinien. Als prognostisch günstiger Faktor hat sich hier besonders die microRNA hsa-miR-21 herausgestellt, deren gesteigerte Expression mit einem längeren progressionsfreien Überleben assoziiert werden konnte [74]. Andere Gruppen konnten dies nicht bestätigen und fanden hsa-miR-127 oder hsa-miR-222 mit einem längeren progressionsfreien Überleben assoziiert [75, 76].

Die Infektion von B-Zellen mit EBV kann erheblichen Einfluss auf das Expressionsmuster humaner microRNAs nehmen. So wird hsa-miR-155 in EBV-negativen DLBCL weniger stark exprimiert als in EBV-positiven DLBCL [77].

1.3.2.3. microRNA Expressionsanalysen primär cerebraler Lymphome

Wenige Studien zur microRNA Expression von Lymphomen des zentralen Nervensystems sind bisher durchgeführt worden. Im Vergleich des primär cerebralen diffus grosszelligen B-Zell Lymphoms und des primär nodalen DLBCL wird hsa-miR-17-5p cerebral stärker exprimiert [78].

1.3.3. EBV-spezifische microRNAs

Im Genom des Epstein-Barr-Virus finden sich, wie auch im Genom der menschlichen Zelle, Abschnitte, die für microRNAs kodieren.

Im Jahr 2004 wurden die ersten fünf viralen microRNAs durch Northern Blotting nachgewiesen. Die Anzahl der bekannten hochkonservierten microRNAs des Epstein-Barr Virus ist bis heute auf 44 gestiegen [67, 79, 80]. Die Aufteilung der viralen microRNAs erfolgt in vier Cluster:

BART-Cluster 1, BART-Cluster 2, BART2-Cluster, BHRF1-Cluster, die zum einen innerhalb des BART Gens und zum anderen innerhalb des BHRF1 Gens liegen [81].

Die Expression der microRNAs der verschiedenen Cluster ist abhängig vom Latenzstadium der EBV-infizierten Zelle, da sich diese teilweise in untranslatierten Regionen latenter Proteine befinden. So werden microRNAs des BHRF1-Clusters vornehmlich in Zellen des Latenzstadiums III und in lytischen Zellen exprimiert, microRNAs des BART-Clusters hingegen werden in Zellen aller Latenzstadien exprimiert [82]. Die Bedeutung der Expression dieser Cluster wird intensiv erforscht. Sicher ist, dass microRNAs die maligne Transformation EBV-infizierter Zellen beeinflussen indem sie die zelluläre Expression proapoptischer Proteine beeinträchtigen aber auch indem sie die Expression von Latenzproteinen herunterregulieren und so die Immunogenität der infizierten Zellen reduzieren [83, 84].

1.4. Ableitung der Fragestellung, Untersuchungshypothese und Studiendesign

Transplantations-assoziierte lymphoproliferative Erkrankungen sind eine schwerwiegende Komplikation nach Organtransplantation und zeigen eine hohe extranodale Manifestationsrate wobei nahezu jedes Organ befallen sein kann. Bei erwachsenen Transplantatempfängern stellt die monomorphe DLBCL-Typ PTLD die histologisch häufigste Subgruppe dar. Das primär cerebrale Auftreten der PTLD ist hingegen selten. Auch hier ist das monomorphe DLBCL-PTLD der häufigste Subtyp.

Die Pathogenese des Posttransplantationslymphoms ist nur in Teilen verstanden. Eine latente EBV-Infektion kann durch die Expression verschiedener Proteine (LMP-1, EBNA1-3, ...) Einfluss auf die Pathogenese nehmen. Auch EBV-spezifische microRNAs können durch eine Über- oder Unterexpression die Zellhomöostase beeinflussen und so die Entstehung maligner Neoplasien begünstigen. Im Gegensatz zu mRNA sind microRNAs außerordentlich stabil und deshalb leicht einer vergleichenden Analyse zugänglich.

Studien zu primär cerebralen PTLD zeigen, dass diese in bis zu 90% mit dem Epstein-Barr Virus assoziiert sind, systemische PTLD hingegen sind nur in 40-50% der Fälle EBV-assoziiert. Auffällig ist zudem, dass EBV-assoziierte systemische PTLD überwiegend in den ersten zwei Jahren nach Transplantation auftreten, wohingegen späte systemische PTLD in 95% der Fälle nicht EBV-assoziiert sind. EBV-assoziierte primär cerebrale PTLD stellen hier mit einer medianen Zeit bis zu Manifestation zwischen 4 und 8 Jahren eine Ausnahme dar. Die

pathogenetische Bedeutung von EBV bei cerebralen PTLD könnte deshalb von der bei systemischen PTLD differieren.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Proteinexpression latenter und lytischer viraler Proteine sowie das microRNA-Expressionsprofil cerebraler und systemischer PTLD zu analysieren und zu vergleichen. Dazu soll anhand von 8 Proben primär cerebraler und 8 systemischer PTLD die Expression latenter und lytischer EBV-Proteine mittels Real-time PCR untersucht werden. Mit Hilfe von microRNA MicroArrays soll anschließend ein microRNA Expressionsprofil 9 cerebraler (8 EBV-assoziiertes, 1 nicht EBV-assoziiertes PTLD) und 16 systemischer PTLD (jeweils 8 EBV-assoziiertes und 8 nicht EBV-assoziiertes PTLD) durch unhierarchisches Clustering erstellt werden.

Basierend auf diesen Analysen sollen cerebrale und systemische PTLD hinsichtlich ihrer Protein- und microRNA-Expressionsprofile miteinander verglichen werden. Es sollen Unterschiede in der Expression EBV-spezifischer wie humaner microRNAs herausgearbeitet werden und Rückschlüsse auf differente pathogenetische Signaltransduktionswege gezogen werden.

2. Methoden

2.1. Patientendaten

Erhoben und ausgewertet wurden nach schriftlicher Einwilligung die Daten von 9 Patienten mit ausschließlichem und primärem Befall des zentralen Nervensystems und von 16 Patienten mit systemischem Befall (ohne Beteiligung des ZNS) durch eine PTLD nach solider Organtransplantation. Die Diagnosesicherung erfolgte in allen Fällen durch die histopathologische Begutachtung einer oder mehrerer Läsionen der PTLD durch einen erfahrenen Pathologen der behandelnden Kliniken/Zentren Deutschlands, Österreichs und Australiens. Alle Proben wurden zunächst in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die Zuordnung der Lymphoproliferation zu einem histologischen Subtyp erfolgte entsprechend der WHO-Klassifikation der Lymphome von 2008.

Eine Assoziation mit dem Epstein-Barr Virus wurde immunhistochemisch durch Antikörperfärbungen gegen die viralen Proteine EBNA2, LMP1 und ZEBRA und/oder durch in-situ-Hybridisierung (*ISH*) für EBER bestimmt. Die Durchführung der genannten Antikörperfärbungen bzw. der ISH erfolgte durch den die Diagnose stellenden Pathologen. Als EBV-assoziiert wurden jene Proben bezeichnet, bei denen eines oder mehrere Proteine angefärbt werden konnten und/oder die EBER-ISH positiv ausfiel.

2.2. RNA Isolation

Die Extraktion der RNA erfolgte aus Gewebeproben, die nach ihrer Entnahme in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet wurden. Von jeder Gewebeprobe wurden drei Schnitte einer Schichtdicke von jeweils 30 µm für die Nukleinsäureisolation eingesetzt.

Die Extraktion erfolgte unter Verwendung des RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Part Number AM1975) entsprechend des Protokolls des Herstellers. Das Paraffin wurde durch Zugabe von Xylol entfernt. Die Entfernung des Xylols erfolgte durch mehrere Waschschrte mit 100-prozentigem Ethanol. Zum Verdau der Proben wurde eine Protease hinzugegeben und 15 min bei 50 °C sowie 15 min bei 80 °C inkubiert. Die Isolation der Nukleinsäuren erfolgte durch Hinzugabe eines Isolationsadditivs sowie 100-prozentigen Ethanols in vier Waschschrten. Die endgültige Aufreinigung der RNA erfolgte durch einen Verdau mittels DNase. Anschließend erfolgten drei weitere Waschschrte und die Aufnahme der Nukleinsäure in einem Gesamtvolumen von 60 µl destillierten Wassers aus dem Filter.

Der Nachweis und die Quantifikation der RNA erfolgten durch UV-Spektroskopie unter Verwendung des NanoDrop ND-1000 Spektroskops. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C .

2.3. cDNA Synthese

Für die Herstellung komplementärer DNA (*cDNA*) wurden 250 ng der zuvor isolierten RNA in einem Reaktionsvolumen von 12 μl eingesetzt. 0,5 μl des Random-Primers „500 Random Hexamer“ wurden hinzugegeben und über 5 Minuten bei einer Temperatur von 65°C inkubiert, um hierdurch eine mögliche Doppelsträngigkeit der verwendeten mRNA aufzuheben und damit die optimale Bindung des Primers zu erzielen. Zur Stabilisierung der Bindung zwischen Primer und mRNA erfolgte die 2 minütige Lagerung auf Eis und anschließend die Zugabe von 4,0 μl 5x First Strand Buffer, 1 μl 10 mM dNTPs, 1,0 μl 0.1M DTT, 0,5 μl RNasein und 1,0 μl der reversen Transkriptase SuperScript III. Die Inkubation erfolgte bei 25°C über 10 min, anschließend die Aktivierung der Reversen Transkriptase bei 50°C und deren Inaktivierung nach 60 min durch Temperaturerhöhung auf 70°C über 15 min. Zur Dilution auf eine Konzentration von 2 ng/ μl wurden 125 μl nukleasefreies Wasser verwendet. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei einer Temperatur von -20°C .

2.4. Real-Time PCR

Das Verfahren der Real-Time Polymerase Chain Reaction (*RT-PCR*) ermöglicht die spezifische Amplifikation von DNA-Abschnitten bei zeitgleicher Detektion der entstehenden Amplifikationsprodukte und deren Quantifikation.

2.4.1. Allgemeine Grundlagen

Die Reaktionen der Real-Time PCR sind analog denen der herkömmlichen PCR: In einem 30-50 mal durchlaufendem Zyklus wird durch Anheben der Temperatur auf ca. 90°C die Einzelsträngigkeit der DNA erzielt, durch Absenken der Temperatur die Hybridisierung des spezifischen Primers ermöglicht, ein erneuter Temperaturanstieg aktiviert schließlich die DNA-Polymerase und führt zur Sythetisierung komplementärer DNA-Stränge.

Die Amplifikation kann in der Real-Time PCR, anders als bei der klassischen PCR, die als Endpunkt-PCR meist eine anschließende Weiterverarbeitung des Amplikons erfordert, unmittelbar in „Real-Time“ über eine entsprechende Software auf dem Computer beobachtet und anschließend unmittelbar ausgewertet werden. Grundlage hierfür bildet die stetige Detektion der Fluoreszenz eines sogenannten Reporter-Fluorochroms, dessen Fluoreszenz z.B. durch eine Interkalation oder Hybridisierung erwirkt werden kann. Die Interkalation eines Fluorochroms, die zu seiner Konformationsänderung und damit einer bis zu 1000-fachen

Erhöhung der Fluoreszenz führt, ist unspezifisch und „generell“, da sie mit jeglicher Art doppelsträngiger Nukleinsäuren zu Stande kommt. Beispiele für interkalierende Fluoreszenzen sind „SYBR green I“ oder „SYBER green gold“, aber auch Ethidiumbromid. Daneben existieren auch „Strang-spezifische“ hydrolysierende und hybridisierende Fluoreszenzmittel.

Änderungen in der Emission des Reporter-Fluorochroms werden als ΔR_n bezeichnet und als Differenz des normalisierten Reportersignals R_n der Probe und des Hintergrundsignals ermittelt. Die fortlaufende Aufzeichnung der Fluoreszenzänderung (als ΔR_n auf der y-Achse) während des Durchlaufens der PCR-Zyklen (x-Achse) lässt nun im idealen Fall eine Kurve erkennen, die in eine lineare Grundphase, frühe exponentielle Phase, Log-lineare Phase und Plateau-Phase zeigt. Die in diesen Phasen gewonnenen Daten lassen eine spätere Berechnung u.a. des Hintergrundsignals, des Schwellen- Zyklus (C_t) und der Amplifikationseffizienz zu. (siehe Abbildung)

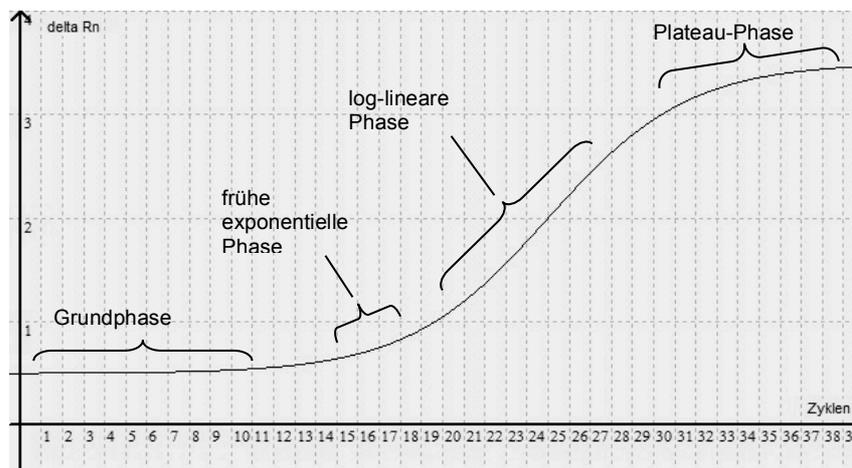


Abbildung 2. Darstellung eines typischen Kurvenverlaufes während des Durchlaufens einer Real-Time PCR Reaktion über 40 Zyklen. Anhand des Kurvenverlaufes werden Grundphase, frühe exponentielle Phase, log-lineare Phase und Plateau-Phase definiert. Die X-Achse zeigt die Anzahl der Zyklen, die Y-Achse die während der Zyklen detektierte Fluoreszenzänderung des normalisierten Reportersignals (*delta Rn*). Abbildung in Anlehnung an [85].

Nach Beginn der PCR und während der ersten PCR- Zyklen, kann kein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzänderung ΔR_n verzeichnet werden. Dies beschreibt die lineare Grundphase und damit die sog. „Baseline“- Fluoreszenz. Der signifikante Anstieg von ΔR_n definiert den „Schwellen- Zyklus“ C_t (Cycle Threshold), der als Parameter zur Quantifikation benötigt wird. Es existieren mehrere Verfahren zur Bestimmung des Schwellenzyklus, immer jedoch liegt er innerhalb der frühen exponentiellen Phase. Charakteristisch und namensgebend für die exponentielle Phase ist deren Effizienz, die im Idealfall zu einer Verdoppelung eines jeden

Templates pro Zyklus führt. In der dritten, linearen Phase, nimmt die Effizienz bereits ab, und endet in der vierten, der Plateau-Phase. Es ist nicht bekannt, warum es zur Abnahme der Effizienz beim Durchlaufen der späten PCR-Zyklen kommt.

Neben der sofortigen Beantwortung der Frage, ob das vermutete Template überhaupt in einer Probe enthalten ist, ermöglicht die Real-Time PCR auch dessen absolute, relative oder vergleichende Quantifikation. Die absolute Quantifikation erfolgt anhand einer Standardkurve, die mit Hilfe eines zuvor sorgfältig quantifizierten Standards erstellt wird. Hierdurch ist es z.B. möglich, die Viruslast eines Mediums zu bestimmen. Zur relativen Quantifikation wird ebenfalls eine Standardkurve erstellt, diese jedoch aus einer Dilutionsreihe eines kalibrierenden Templates. Dies ermöglicht Studien zur Genexpression. Bei der vergleichenden Quantifizierung wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, muss keine Standardkurve erstellt werden. Anstatt dessen wird ein kalibrierendes Template als einfacher Standard angesehen und die Ergebnisse der Amplifikation auf dieses bezogen. Dies ermöglicht die Verifizierung eines Trends.

2.4.2. Primer, Amplifikation und Quantifikation

Die für diese Arbeit verwendeten Vorwärts- und Rückwärtsprimer sind Tabelle 2 zu entnehmen. Sämtliche Primer wurden von der Firma Geneworks bezogen und in nukleasefreiem Wasser zu einer Konzentration von 10 µM resuspendiert.

Primer	Vorwärts-Primer 5' – 3'	Rückwärts-Primer 5' – 3'	Größe des Amplikons
B2M	ACTCTCTCTTTCTGGCCTGGAG	CATTCTCTGCTGGATGACGTGAG	77bp
BZLF1-2	TACAAGAATCGGGTGGCTTC	AGCAGCCACCTCACGGTA	79bp
BLLF1	ATTGGTGGCATTCTCTGAGC	CCCCATACGAAGGCTGTCTA	63bp
EBER1-2	TTTGCTAGGGAGGAGACGTGTG	ACAGACACCGTCCTCACCACCC	77bp
EBNA2	GGCTTAGCCAGTAACCCAGCAC	GCGGGTGCTTAGAAGGTTGTTGG	100bp
EBNA3A-	GGCTACGCGCATCGACACA	TGTACATCTCGGTATTTGAAATCTGGG	71bp
LMP1-2	TTGTATACTCCTACTGATGATCACCTCC	ACAATGCCTGTCCGTGCAAATTCC	68bp

Tabelle 2. Name, Sequenz und Amplikongröße der für die Reaktionen der Real-Time PCR verwendeten Primer.

5 µl cDNA wurden mit je 0,4 µl des entsprechenden Vorwärts- und Rückwärtsprimers und 10 µl des sog. „RT-PCR-Mix“ in einem Reaktionsvolumen von 20 µl in der Real-Time PCR Maschine „Rotorgene 3000“ der Firma Corbett amplifiziert. Im RT-PCR-Mix enthalten waren u.a. die Taq-Polymerase und das Fluoreszenz SYBR green. Für sämtliche Primer wurde zur Aktivierung der

Taq-Polymerase eine initiale Temperatur von 95 °C für 10 min gewählt. Die anschließenden 45 PCR-Zyklen wurde bei der Verwendung der Primer BZLF1, BRLF1, BLLF1, EBNA3A, LMP1 im ersten Schritt bei 95 °C für 15 sec und im zweiten Schritt bei 60 °C für 60 sec durchlaufen. Abweichend hiervon wurden bei der Verwendung der Primer EBNA2 und EBER1 45 PCR-Zyklen im ersten Schritt bei 95 °C für 15 sec und im zweiten Schritt bei 62 °C für 30 sec durchlaufen. Die Fluoreszenz wurde jeweils am Ende der 60 °C bzw. 62 °C Schrittes im „FAM/SYBR Green Modus“ der Real-Time PCR Maschine ermittelt und aufgezeichnet. Hierbei erfolgte die Exzitation des SYBR green bei 470 nm und die anschließende Detektion des Signals bei 510 nm. Das nach Beendigung der 45 Zyklen durchgeführte „Melting“ der Amplifikate, erfolgte durch eine schrittweise um 0,5 °C für 5 sec gehaltene Erhöhung der Temperatur von 60 bzw. 62 °C auf 95 °C.

Die vergleichende Quantifikation wurde mit Hilfe der „Corbett Rotorgene 6“ Software vorgenommen. Diese Art der Quantifikation erfordert die Bestimmung des sog. „Take off“ Punktes, der anstelle des Threshold-Zyklus tritt. Durch die zweite Ableitung der aufgezeichneten Fluoreszenzkurve (siehe oben), wird das Maximum der exponentiellen Amplifikation errechnet und 20% dessen als „Take off“ Punkt definiert. Die Steigung der Geraden zwischen „Take-off“ Punkt und Maximum entspricht der Effizienz der Reaktion und wird zur vergleichenden Quantifikation benötigt, die nach der Formel

$$\text{fold-change} = \text{Effizienz}^{C_{t1} - C_{t2}}$$

ermittelt wird. C_{t1} und C_{t2} sind hierbei die Take-off Punkte der zu vergleichenden Kurven. Das Expressionslevel einer mRNA wurde jeweils in Relation zur Expression der korrespondierenden mRNA in der lymphoblastoiden B-Ziellinie ScBu bestimmt (Positivkontrolle) und auf die Expression von Beta-2-Mikroglobulin normalisiert. Alle Experimente wurden doppelt durchgeführt und nur jene zur Auswertung verwendet, die in der Schmelzkurvenanalyse einen eindeutigen Peak des Amplikons zeigten. Als Negativkontrolle wurde Wasser verwendet. Als EBV-positiv wurden Proben gewertet, deren EBER-Expressionslevel nach vergleichender Quantifikation zu ScBu und Normalisierung zu Beta-2-Mikroglobulin $>0,1$ waren.

2.5. MicroRNA Microarray Analyse

Zur Detektion der microRNA und der Analyse ihres relativen oder absoluten Expressionslevels stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Dies sind neben Northern-Blotting, Klonierung, in situ Hybridisierung, „deep Sequencing“ und Real-time PCR die Verwendung von microRNA-Microarrays.

2.5.1. Allgemeine Grundlagen

Die kurze, nur ~22 nt lange microRNA, ist aufgrund ihrer geringen Länge gegenüber der mRNA relativ stabil und auch in Paraffin fixiertem Gewebe wenig degradiert. Ihr Expressionsprofil ist daher gut ermittelbar und ermöglicht eine retrospektive Auswertung auch in mehr als 8 Jahre lang asserviertem Gewebe [74, 86]. Die Technik des microRNA-Microarrays ermöglicht eine schnelle und parallele Analyse tausender verschiedener humaner, viraler, bakterieller u.a. microRNAs.

Die Basis des Microarrays stellt die Hybridisierung von Nukleinsäuren eines fluoreszenzmarkierten Targets einerseits und seiner korrespondierenden und zugleich komplementären Sonde andererseits dar. Die Sonde ist hierbei eine, häufig auf eine Glasplatte aufgebrachte, Abfolge synthetisch hergestellter Oligonukleotide oder cDNA Fragmente, die der zu untersuchenden microRNA komplementär sind. Zur Aufbringung und Befestigung dieser Sonden stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Es werden z.B. Oligonukleotid-Sonden verwendet, die an ihrem 5' Ende eine poly-T- oder poly-A-Sequenz sowie eine Aminmodifikation aufweisen („Linker“) mit der sie mit einem auf eine Glasplatte aufgebrachten sog. Self-assembly Monolayer (SAM) eine Aminbindung eingehen. Gegensätzlich zu dieser „herkömmlichen“ Verfahrensweise, können Oligonukleotide auch durch die sogenannte „SurePrint Technology“ aufgebracht werden. Hierbei wird jedes Nukleotid einzeln nacheinander aufgebracht und mittels Phosphoramid-Chemikalien zu einem Oligonukleotidstrang verbunden. So können mit hoher Präzision und Effektivität Sonden direkt auf eine Glasplatte synthetisiert werden. Zusätzlich kann hierbei an das 5'-Ende der Sonde eine „Hairpin-Struktur“ synthetisiert werden, die zu einer erhöhten Spezifität für das Target führt. Zugleich kann so auch die Schmelztemperatur der microRNAs vereinheitlicht werden und die Hybridisierung bei einer einzigen Temperatur erfolgen.

Die Fluoreszenz-Markierung des Targets, also der microRNA, kann direkt oder indirekt erfolgen. Zur direkten Markierung stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung, wie z.B. die Verwendung eines Guanin-markierenden Fluoreszenz. Ebenso können fluoreszierende Nukleotide durch eine RNA-Ligase an das 3' Ende der microRNA synthetisiert werden. Indirekte Fluoreszenzmarkierungen markieren nicht die microRNA selbst, sondern ihre cDNA, die als Produkt einer Reversen Transkriptase-PCR Reaktion entsteht. Hierbei können z.B. die verwendeten Primer mit einem Fluorochrom gekoppelt werden.

In einer Reaktionskammer erfolgt dann die Hybridisierung der microRNAs auf die Oligonukleotidsonden. Sind den Sonden komplementäre microRNAs in einer Probe enthalten, binden diese und es kann an entsprechender Stelle eine Fluoreszenz detektiert werden. Die Normalisierung des Arrays ist kompliziert und abhängig von der verwendeten Hard- und

Software. Es existiert keine absolute Regel, weshalb auf unterschiedliche Weise verfahren wird. Meist wird zunächst ein Hintergrundsignal durch endogene bzw. exogene Positivkontrolle sowie Negativkontrollen ermittelt.

2.5.2. Setting dieser Dissertation

Die Markierung der extrahierten RNA, die Hybridisierung des microRNA Microarray Chips und die Detektion der Rohsignale wurden durch das Ramacotti Centre in Sydney durchgeführt.

Die Markierung der microRNA erfolgte unter Verwendung des „Agilent’s miRNA Complete Labeling and Hyb Kit (p/n 5190-0456)“. Es wurde entsprechend Vorgaben des Protokolls verfahren. Unter Verwendung von 100 ng der zuvor extrahierten RNA erfolgte die direkte Markierung der microRNA durch die Ligation eines Cyanine 3-pCp-Moleküls an das 3’ Ende der microRNA durch eine RNA-Ligase. Die anschließende Purifikation der markierten microRNA erfolgte durch die Zentrifugation durch einen Filter.

Die microRNA Microarrays „Human miRNA Microarray Release 16.0, 8x60K“ wurden von der Firma Agilent bezogen. Auf einer Glasplatte der Größe 1“x3“ befinden sich 8 individuelle microRNA Microarrays. Jedes einzelne Array umfasst 15000 Spots und damit in 15-20 facher Wiederholung alle zum derzeitigen Zeitpunkt bekannten 1223 menschlichen und 44 EBV microRNAs sowie alle anderen bekannten menschlichen viralen microRNAs der Sanger Datenbank Version 16 [67]. Die jeweils 60 Nukleotide langen Sonden wurden durch die „SurePrint Technology“ (siehe oben) auf die Glasplatte aufgebracht.

Die Hybridisierung des Arrays erfolgte entsprechend des Protokolls der Firma Agilent „miRNA Microarray System with miRNA Complete Labeling and Hyb Kit Protocol, Version 2.2, October 2009“.

Das Auslesen und Erfassen der Rohdaten des Microarray Chips erfolgte durch den „Agilent high resolution scanner“ unter Verwendung der „Scan control software version 8.0“. Die Qualitätskontrolle der Proben und die Normalisierung zum Hintergrundsignal erfolgten durch Agilents „Feature Extraction software“. Nur Proben ausreichender Qualität wurden zu weiteren Auswertungen zugelassen. Um die Streuung der Intensitäten der verwendeten Sonden eines einzelnen Arrays allen verwendeten Arrays anzugleichen, wurde die quantile Normalisierung der „Genespring Software“ angewendet [87].

2.6. Statistik

Alle statistischen Analysen zur Expression latenter und lytischer Proteine wurden mit Hilfe der Graph Prism Software 5 durchgeführt. Messvergleiche wurden mittels nicht-parametrischem Mann-Whitney U-Test erstellt und der resultierende p-Wert entsprechend Tabelle 3 interpretiert.

p- Wert	in Worten	Kürzel
< 0,001	extrem signifikant	***
0,001 – 0,01	sehr signifikant	**
0,01 – 0,05	signifikant	*
> 0,05	nicht signifikant	ns

Tabelle 3. Definition der Grenzen der verwendeten p- Werte und deren Abkürzung.

Messvergleiche der microRNA Expression wurden durch t-Tests unter Verwendung der Software „Genepattern“ ermittelt. Zur Auswertung von Unterschieden in der microRNA Expressionen wurde eine Falsch-Positiven Rate *FDR* von <0,05 verwendet, wenn $p < 0,05$ war.

3. Ergebnisse

3.1. Klinische Daten

Die klinischen Daten der 9 Patienten mit primär cerebralem PTLD sind in den Tabelle 4 und Tabelle 5 zusammengefasst.

Das mediane Alter der überwiegend weiblichen Patienten (8/9) mit cerebralem PTLD betrug 54,33 Jahre (min. 38, max. 74 Jahre). 7 Patienten waren nierentransplantiert, ein Patient lebertransplantiert und ein Patient kombiniert nieren- und pankreastransplantiert. 3/9 Patienten zeigten eine solitäre Läsion, 6/9 Patienten hatten mehrere Läsionen.

Die Immunsuppression der Patienten mit cerebralem PTLD erfolgte überwiegend mit einer Mycophenolat Mofetil (*MMF*)-haltigen Kombinationstherapie (7/9) zusammen mit einem Steroid (4/7), mit Cyclosporin A (*CyA*, 2/7) oder mit Tacrolimus (*FK-506*, 1/7). Ein Patient erhielt eine immunsuppressive Kombinationstherapie aus *CyA* und einem Steroid, ein weiterer eine Kombinationstherapie aus *CyA*, *FK-506* und einem Steroid.

Die Therapie der Patienten mit cerebralem PTLD war uneinheitlich, beinhaltete aber in der Mehrzahl der Fälle (6/9) eine Ganzhirnbestrahlung oder eine Hochdosis-Therapie mit MTX (1/9) und/oder Cytarabin (4/9) und Rituximab (3/9). (Tabelle 5)

Nummer	Alter/ Sex	transplantiertes Organ	Zeit von SOT bis PTLD (Monate)	Anzahl Läsionen und Hauptbefall	Ann-Abor Stadium
CNS 1	67/f	Niere	115	>1 rechts temporoparietaler Lappen	IV E
CNS 2	57/f	Niere	163	>1 Cerebellum	IV BE
CNS 3	54/f	Niere	162	>1 Hirnstamm, Hirnlappen	IV E
CNS 4	74/f	Niere	101	1 rechts frontaler Lappen	I E
CNS 6	43/m	Leber	58	1 rechts occipitaler Lappen	I AE
CNS 7	60/f	Niere	46	1 links occipitaler Lappen	I AE
CNS 8	43/f	Niere	142	>1 rechts fronto-parietaler Lappen	IV E
CNS 10	53/f	Niere	320	>1 beide frontalen Lappen	IV AE
CNS 11	39/m	Niere/Pankreas	120	>1 rechts frontaler Lappen	IV E

Tabelle 4. Charakteristika der 9 Patienten mit primär cerebralem PTLD (CNS1-4, 6-8, 10-11). f=weiblich, m=männlich, SOT=solide Organtransplantation, PTLD=Posttransplantationslymphom

Nummer	Immunsuppression bei Erstdiagnose				Erstlinien Behandlung	Zweitlinien Behandlung	Drittlinien Behandlung	Letztes Follow up			OS/ Monate
	MMF	CyA	FK	ST				Status	Tod	Todes- ursache	
CNS 1	+				Exstription/ R i.th.	-	-	2	+	TRM	2.6
CNS 2	+		+	+	Exstription /HD-MTX	Radiatio	-	2	+	PTL D	2.5
CNS 3	+			+	HD-AraC	Radiatio	-	2	+	?	32.6
CNS 4	+			+	Exstription /Radiatio/ Rituximab	-	-	1	+	TRM	1.8
CNS 6		+		+	HD-AraC	Radiatio	-	2	+	TRM	3.8
CNS 7	+	+		+	Exstription /Radiatio	HD-AraC	Radiatio	2	+	?	21.4
CNS 8	+				HD-AraC/ Rituximab	-	-	1	-		>66.2
CNS 10	+	+			Radiatio	-	-	1	-		>5.6
CNS 11		+	+	+	Rituximab	Rituximab		2	-		>106

Tabelle 5. Angaben zur Immunsuppression vor Therapiebeginn, der 1. ggf. 2. bzw. 3. Linientherapie, dem Status bei letztmaligem Kontakt (1= in Remission, 2=Rezidiv/Progress) und Gesamtüberleben (OS) der Patienten mit primär cerebralem PTLD. MMF=Mycophenolat Mofetil; CyA=Cyclosporin A; FK= Tacrolimus, ST= Steroid; R i.th.= Rituximab intra thekal; MTX= Methotrexat, HD AraC=Hochdosis Cytarabin; TRM= therapiebedingte Toxizität; ?= unklare Todesursache.

3.2. Virale Proteinexpression bei cerebralen und systemischen PTLD

DLBCL-Typ PTLD sind in ca. der Hälfte der Fälle mit dem Epstein-Barr Virus assoziiert, was die Transformation der B-Zelle und damit die Entstehung von PTLD begünstigen kann. Ursächlich hierfür ist u.a. die Expression latenter und lytischer viraler Proteine wie EBNA2, EBNA3A und LMP1 bzw. BZLF1, BRLF1 und BLLF1.

3.2.1. Histologie

Die histopathologische Untersuchung der cerebralen und systemischen PTLD erfolgte zentral durch einen in der Diagnostik der PTLD sehr erfahrenen Referenzpathologen und umfasste neben der Bestimmung des histologischen Subtyps den Nachweis einer evtl. EBV-Assoziation und die Bestimmung des EBV-Latenztyps.

Alle untersuchten PTLD zeigten eine Proliferation der B-Zellreihe. In 15/16 systemischen und in 8/9 primär cerebralen PTLD handelte es sich um monomorphe CD20-positive PTLD vom Subtyp eines DLBCL. Ein cerebrales PTLD (CNS 7) wurde als Plasmozytom-ähnliches PTLD klassifiziert, ein systemisches PTLD (PTLD 12) wurde als polymorphes PTLD klassifiziert.

Tabelle 6 (Seite 39) zeigt die Ergebnisse der Antikörperfärbung gegen die Proteine LMP1, EBNA2 und BZLF1 und die Ergebnisse der EBER-in-situ-Hybridisierung. Daraus ergibt sich (zum Teil nach Ergänzung der Daten durch die Ergebnisse der Real-time-PCR) eine EBV-Assoziation in 16/25 der untersuchten Fälle. Hierbei zeigen 8/9 der primär cerebralen PTLD die Expression zumindest eines der latenten viralen Proteine. Das nicht EBV-assoziierte cerebrale PTLD CNS 6 zeigt immunhistochemisch keine Expression latenter EBV-Proteine und war auch in der Real-time PCR negativ für EBER.

Unter den systemischen PTLD konnten bei PTLD 1, 2, 3, 4, 5, 6, und 20 weder virale Proteine noch EBER nachgewiesen werden, hier liegt demnach ebenfalls keine EBV-Assoziation vor. PTLD 7 zeigt immunhistochemisch keine EBNA2- und LMP1-Expression, nach Quantifikation mittels Real-time PCR auch keine EBER-Expression und ist damit ebenfalls als nicht EBV-assoziiert anzusehen.

3.2.2. Expression latenter viraler Proteine mittels Real-time PCR

Zum Vergleich der relativen Expressionsstärke viraler Gene zwischen EBV-assoziierten primär cerebralen und EBV-assoziierten systemischen PTLD, erfolgte die Bestimmung der relativen Expression der latenten viralen Proteine EBNA2, EBNA3A, LMP1 und des EBER durch die Real-time PCR.

In der Gruppe der cerebralen PTLD konnte in 8/9 PTLD die virale RNA EBER amplifiziert und relativ zur lymphoblastoiden Zelllinie ScBu quantifiziert und auf das Expressionsniveau von B2M normalisiert werden. Eine fehlende Amplifikation von EBER zeigt sich bei CNS 6, das damit als einziges primär cerebrales PTLD nicht EBV assoziiert war. Die Ergebnisse decken sich dabei mit den verfügbaren Daten der EBER-ISH. Innerhalb der Gruppe der cerebralen PTLD schwankt das EBER-Expressionsniveau stark, etwa um den Faktor 30 und umfasst einen Wertebereich von 3,2 bis 86,7 (Abbildung 3).

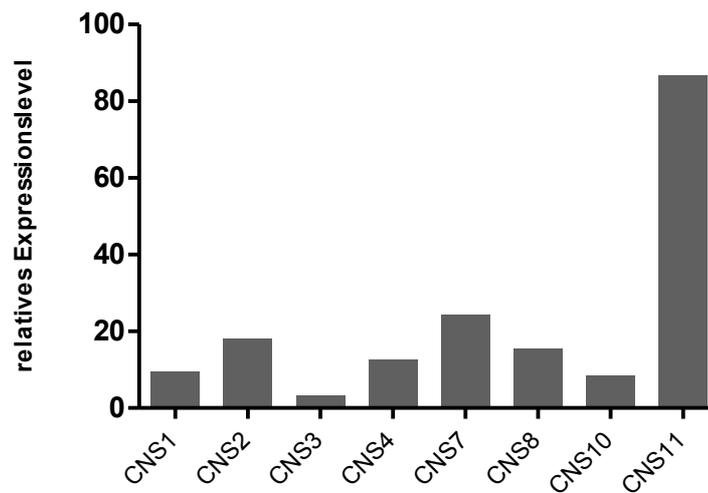


Abbildung 3. Relatives EBER-Expressionslevel der EBV-assozierten, cerebralen PTLD im Vergleich zur LCL ScBu, normalisiert zu B2M.

Aus 8 der 16 Gewebeproben der systemischen PTLD, konnte EBER amplifiziert werden. Damit bestätigt sich die auch bereits histopathologisch fehlende EBV-Assoziation von PTLD 1-7 und 20. Eine in ihrem Level um das 20-fache schwankende EBER Expression, mit einem Minimum von 6,8 und Maximum von 111,9, konnte bei PTLD 8, 10, 12, 13 und 22-25 ermittelt werden, die somit eine EBV-Assoziation aufwiesen. (Abbildung)

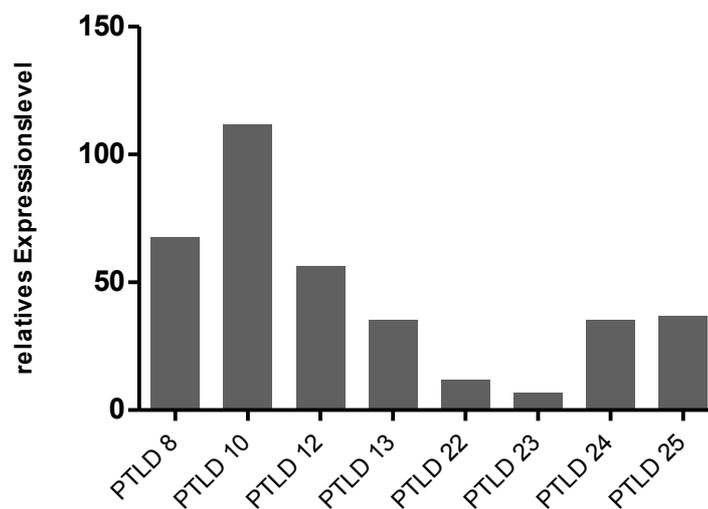


Abbildung 4. Relatives EBER-Expressionslevel der EBV-assozierten, systemischen PTLD im Vergleich zur LCL ScBu, normalisiert zu B2M.

Die Ergebnisse der Expression der latenten Proteine EBNA2, EBNA3A und LMP1, die den Abbildungen 5 und 6 zu entnehmen sind, wurden aufgrund der starken Heterogenität der EBER-Expression zu dieser normalisiert. Die latenten viralen Proteine der Gruppe der cerebralen PTLD wurden heterogen exprimiert und ließen zwei Formen von Latenz erkennen. Dies war zum einen das Latenzstadiums II (CNS 11). Hier konnte nur LMP1 aber nicht EBNA2 und EBNA3A nachgewiesen werden. Die meisten anderen cerebralen PTLD zeigten eine Expression aller latenten Proteine und können damit eindeutig dem Latenztyp III zugeordnet werden. CNS 3 zeigte keine EBNA2 aber eine LMP1 und EBNA3A-Expression und ist daher ebenfalls dem Latenztyp III zuzuordnen. Die Expression von EBNA3A setzt die die Aktivierung der Cp/Wp Promotoren voraus. Es werden bei Aktivierung dieser Promotoren sämtliche EBNA's transkribiert, weshalb ein Latenztyp III vorliegt.

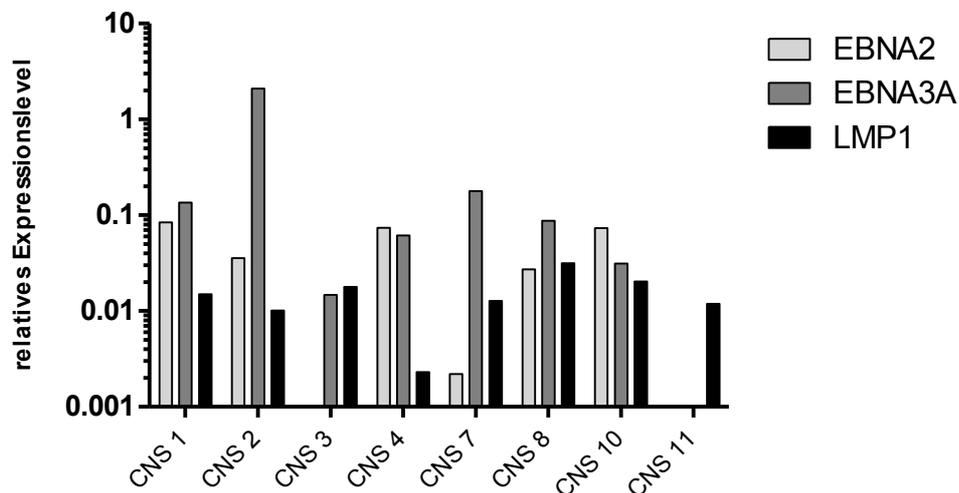


Abbildung 5. Relatives EBNA2-, EBNA3A- und LMP1-Expressionslevel der EBV-assoziierten, ZNS-PTLD im Vergleich zur LCL ScBu, normalisiert zu B2M, relativ zum EBER-Expressionslevel.

Als das am stärksten exprimierte Protein cerebraler PTLD zeigt sich mit einem mittleren Expressionslevel von $0,3256 \pm 0,2537$ EBNA3A, das zugleich signifikant ($p=0,0499$) stärker exprimiert wird als LMP1 (Mittel= $0,01524 \pm 0,003$). Zu EBNA2A, dessen mittleres Expressionslevel $0,03705 \pm 0,01263$ beträgt, unterscheidet sich weder die EBNA3A- noch die LMP1-Expression signifikant (siehe Abbildung).

Die heterogen exprimierten latenten viralen Proteine der systemischen EBV-assoziierten PTLD zeigen, in Hinblick auf die Zuordnung eines Latenztyps, in 6/8 Fällen eine vorhandene Expression der Proteine LMP1, EBNA2 sowie EBNA3A und entsprechen damit ebenfalls dem

Latenztyp III. Als Ausnahme zeigen sich PTLD 8 und PTLD 13. In beiden Fällen gelang keine Amplifikation von LMP1. PTLD 13 zeigt jedoch eine Expression von EBNA2 und in beide Fällen zeigte sich eine Expression von EBNA3A, weshalb beide PTLD ebenfalls dem Latenztyp III zugeordnet wurden (Abbildung 6).

Abbildung 6 gibt einen Überblick über die mittleren relativen Expressionslevel der latenten viralen Proteine der systemischen PTLD und zeigt EBNA3A mit dem Mittel $0,5817 \pm 0,3727$ am stärksten und LMP1 mit dem Mittel von $0,2063 \pm 0,0094$ am schwächsten exprimiert. Aufgrund der starken Streuung der Einzelwerte, ergeben sich trotz der ~ 14 bzw. ~ 28 -fach stärkeren Expression von EBNA3A gegenüber EBNA2 (Mittel= $0,04105 \pm 0,02584$) bzw. LMP1 keine signifikanten Unterschiede.

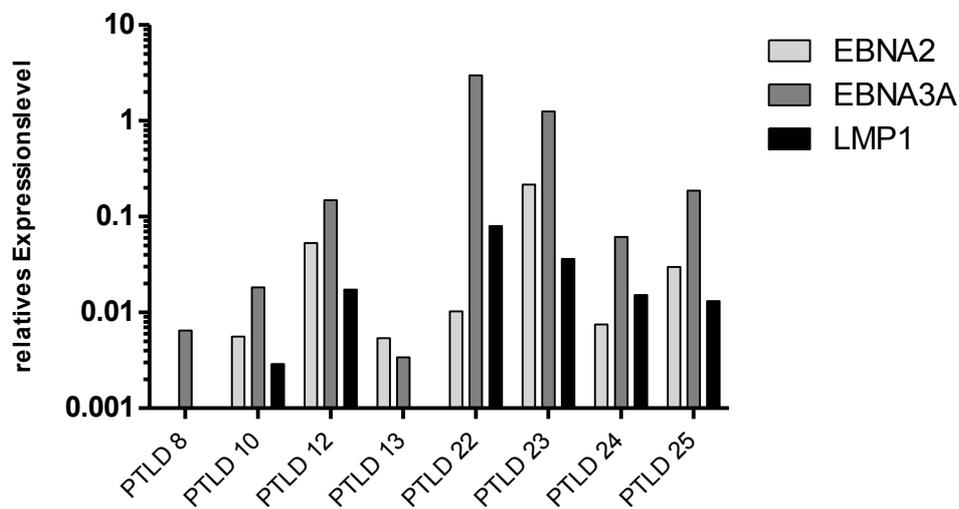


Abbildung 6. Relatives EBNA2, EBNA3A und LMP1 Expressionslevel der EBV assoziierten, systemischen PTLD in Vergleich zur LCL ScBu, normalisiert zu B2M, relativ zum EBER- Expressionslevel.

Bei einer vorbekannt höheren Frequenz einer EBV-Assoziation der cerebralen PTLD, zeigt sich bei der quantitativen Analyse der Expression der Latenzproteine LMP1, EBNA2 und EBNA3A somit kein signifikanter Unterschied in den vorgefundenen Latenztypen: vorherrschend findet sich bei systemischen wie cerebralen PTLD ein Latenztyp III. Bei den cerebralen PTLD wird vereinzelt auch ein Latenztyp II gefunden. In beiden Gruppen zeigte sich in einzelnen Fällen ein Expressionsausfall eines der Latenzantigene, sodass bei isolierter Bestimmung von EBNA1, EBNA2 und LMP1 eine fälschliche Zuordnung zu einem Stadium restringierter Latenz resultieren kann. Ob das Fehlen von EBNA2 bei vorhandener Expression von EBNA3A in 2 untersuchten PTLD auf eine, wie in vorangegangenen Studien beschriebene, Deletion von

EBNA2 zurückzuführen ist, bedarf jedoch weiterer Untersuchungen [88]. Dies macht deutlich, dass die Bestimmung zusätzlicher Latenzgene wie EBNA3A sinnvoll ist. Sowohl in cerebralen als auch systemischen PTLD wird EBNA3A am stärksten und LMP1 am schwächsten exprimiert.

Nummer	Histolog. Subtyp	latente Proteine			lytische Proteine				LT
		LMP1	EBNA2	EBNA3A	BZLF1	BRLF1	BLLF1	EBER	
CNS 1	DLBCL	+	+	+	+	+	+	+	III
CNS 2	DLBCL	+	+	+	+	+	+	+	III
CNS 3	DLBCL	+	-	+	-/+	+	+	+	III
CNS 4	DLBCL	+	+	+	+	+	+	+	III
CNS 7	Plasmozytom-ähnlich	+	+	+	+	+	+	+	III
CNS 8	DLBCL	+	+	+	-	+	+	+	III
CNS 10	DLBCL	+	+	+	+	+	+	+	III
CNS 11	DLBCL	+	-	-	+	+	-	+	II
CNS 6	DLBCL	-	-	-	-	-	-	-	-
PTLD 8	DLBCL	-	-	+	+	+	+	+	III
PTLD 10	DLBCL	+	+	+	+	+	+	+	III
PTLD 12	polymorph	+/-	+	+	-	+	+	+	III
PTLD 13	DLBCL	-	+	+	+	+	+	+	III
PTLD 22	DLBCL	+	+	+	+	+	+	+	III
PTLD 23	DLBCL	+	+	+	+	+	+	+	III
PTLD 24	DLBCL	+	+	+	+	+	+	+	III
PTLD 25	DLBCL	+	+	+	+	+	+	+	III
PTLD 1	DLBCL	-	-	-	-	-	-	-	-
PTLD 2	DLBCL	-	-	-	-	-	-	-	-
PTLD 3	DLBCL	-	-	-	-	-	-	-	-
PTLD 4	DLBCL	-	-	-	-	-	-	-	-
PTLD 5	DLBCL	-	-	-	-	-	-	-	-
PTLD 6	DLBCL	-	-	-	-	-	-	-	-
PTLD 7	DLBCL	-	-	-	-	-	-	-	-
PTLD 20	DLBCL	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 6. pCNS PTLD (CNS1-11) und systemischen PTLD (PTLD1-25): Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung gegen EBNA2, LMP1, BZLF1 und der In-situ-Hybridisierung von EBER und dem sich daraus ergebenden Latenztyp (LT). DLBCL=diffus großzelliges B-Zell Lymphom, + = positiv, - = negativ, rot=Ergebnisse der real-time PCR (immunhistochemische Färbung nicht durchgeführt), schwarz=Ergebnisse der Immunhistochemie (in allen Fällen konkordant zu den Ergebnissen der real-time PCR).

3.2.3. Expression lytischer Proteine mittels Real-time PCR

Die Expression lytischer Proteine konnte durch die immunhistologische Färbung des BZLF1 bei einigen PTLD nachgewiesen werden. Zur Bestimmung des relativen Expressionslevels und der

Klärung, ob bei Expression des immediate early Antigens BZLF1 der replikativ lytische Zyklus in den einzelnen Lymphomen vollständig durchlaufen werden kann, wurden alle cerebralen und systemischen PTLD auf die Expression des BZLF1, BRLF1 und BLLF1 hin untersucht.

Alle cerebralen PTLD exprimierten zumindest eines der untersuchten lytischen Proteine. 7 der 8 EBV-assoziierten cerebralen PTLD exprimierten BZLF1. Die Betrachtung der Expression aller lytischen Proteine zeigte aber, dass nur in 6/8 Fällen der komplette lytische Zyklus durchlaufen wird und damit neben BZLF1 auch BRLF1 und BLLF1 exprimiert wurden. Bei den beiden Ausnahmen CNS 8 und CNS 11, die keine BZLF1 bzw. BLLF1 Expression zeigten, kann angenommen werden, dass der replikativ lytische Zyklus abortiv verläuft (Abbildung).

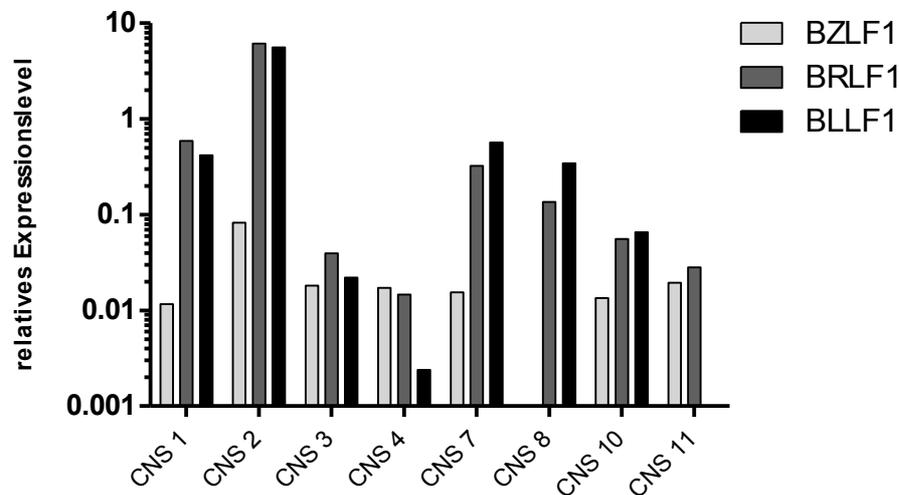


Abbildung 7. Relatives Expressionslevel der lytischen viralen Proteine BZLF1, BRLF1, BLLF1 der primär cerebralen EBV-assoziierten PTLD im Vergleich zur LCL ScBu, normalisiert zu B2M, relativ zum EBER-Expressionslevel des jeweiligen PTLD.

BRLF1, dessen Expression im Mittel $0,9184 \pm 0,7522$ betrug, zeigte das stärkste Expressionslevel lytischer Proteine unter den cerebralen PTLD und unterscheidet sich damit signifikant ($p=0,0104$) von dem im Allgemeinen relativ schwach exprimierten BZLF1 (Mittel= $0,02225 \pm 0,008874$). Keine signifikanten relativen Expressionsunterschiede zeigten sich aufgrund der starken Streuung im Vergleich von BLLF1 und BZLF1 ($p=0,1149$), auch wenn im Mittel die BLLF1-Expression mit $0,8765 \pm 0,6783$ das ~39-fache der BZLF1-Expression betrug (Abbildung).

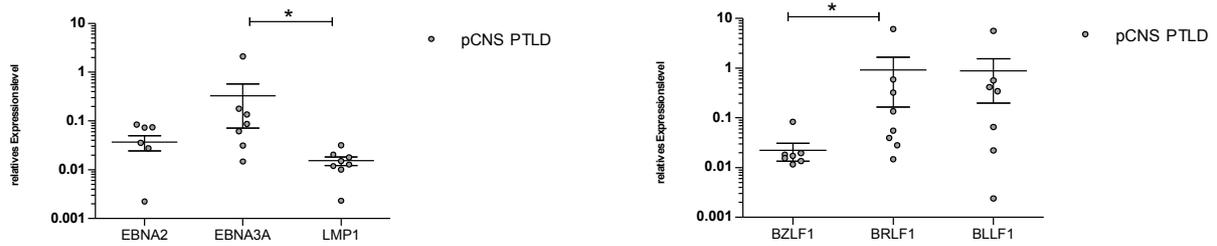


Abbildung 8. Mittel und Standardfehler des Mittels des relativen Expressionslevel der lytischen und latenten viralen Proteine der EBV-assoziierten pCNS PTLD im Vergleich zur LCL ScBu, normalisiert zu B2M, relativ zum EBER-Expressionslevel des jeweiligen PTLD. Zu beachten ist die fehlende Darstellung des Expressionslevels von BZLF1 CNS 8 (=0,0), BLLF1 CNS 11 (=0,0) und EBNA2 CNS 3 (=0,0) und EBNA3A von CNS 11 (=0,0). Signifikant stärkere Expression von EBNA3A gegenüber LMP1 ($p=0,0499$) sowie signifikant stärkere Expression des BRLF1 gegenüber BZLF1 ($p=0,0104$).

Auch die systemischen PTLD zeigten ein schwankendes Level der Expression lytischer Proteine. Sie exprimierten in 7 von 8 Fällen (Ausnahme PTLD 12) das lytische Protein BZLF1 und in allen Fällen BRLF1 und BLLF1. Alle systemischen PTLD, mit Ausnahme von PTLD 12, scheinen damit vollständig den replikativ lytischen Zyklus durchlaufen zu können. Es fällt daneben auf, dass einige der EBV-assoziierten systemischen PTLD, z.B. PTLD 22, 23 und 25 ein höheres Expressionslevel aller oder einzelner lytischer Proteine zeigten. Gegenüber anderen PTLD, z.B. PTLD 13, war die Expression bis zu 1000-fach höher (Abbildung 9).

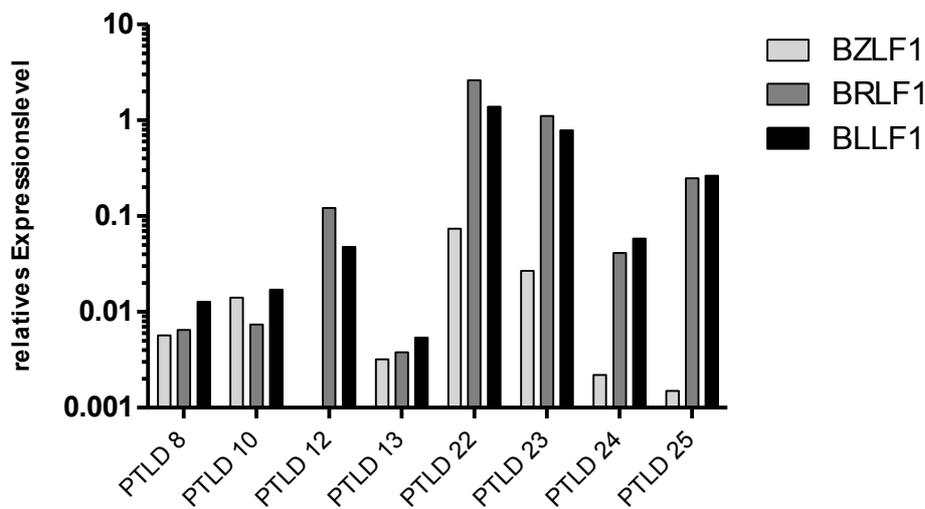


Abbildung 9. Relatives Expressionslevel der lytischen viralen Proteine BZLF1, BRLF1, BLLF1 der systemischen EBV-assoziierten PTLD in Vergleich zur LCL ScBu, normalisiert zu B2M, relativ zum EBER-Expressionslevel.

Von allen untersuchten lytischen Proteinen, wurde durch die systemischen PTLD BRLF1 am stärksten, BZLF1 hingegen am schwächsten exprimiert. Dabei überstiegen die Mittel der relativen Expressionslevel von BRLF1 ($0,5197 \pm 0,3275$) und BLLF1 ($0,3218 \pm 0,1783$) deutlich die des BZLF1 ($0,01594 \pm 0,00887$). Diese Unterschiede waren statistisch signifikant (jeweils $p=0,0281$). Kein signifikanter Unterschied hingegen zeigte sich zwischen der BRLF1 und BLLF1 Expression ($p=0,878$) (Abbildung).



Abbildung 10. Mittel und Standardfehler des Mittels des relativen Expressionslevels der lytischen und latenten viralen Proteine der systemischen EBV-assoziierten PTLD in Vergleich zur LCL ScBu, normalisiert zu B2M, relativ zum EBER-Expressionslevel des jeweiligen PTLD. Zu beachten ist die fehlende Darstellung des BZLF1 Expressionslevel (0,0) von PTLD 12, die fehlenden Darstellungen der EBNA2- und LMP1-Expressionlevel (=0,0) von PTLD 8 und PTLD 13. Signifikant stärkere Expression von BRLF1 und BLLF1 gegenüber BZLF1 (jeweils $p=0,0281$).

In beiden Gruppen, den primär cerebralen und den systemischen EBV-assoziierten PTLD, exprimierten alle PTLD somit zumindest ein lytisches Protein und konnten zumeist auch den kompletten lytischen Zyklus durchlaufen. In beiden Gruppen gab es jeweils einen Fall in dem keine BZLF1 Expression gefunden wurde. Anders als bei den systemischen PTLD, zeigten cerebrale PTLD in 2 Fällen abortive lytische Zyklen. Sowohl in cerebralen, als auch systemischen PTLD wurde das early lytic Protein BRLF1 am stärksten und BZLF1 am schwächsten exprimiert. Insgesamt besteht damit auch in der Expression der lytischen Proteine von EBV qualitativ wie quantitativ kein ersichtlicher Unterschied zwischen cerebralen und systemischen PTLD.

3.2.4. Vergleich der Proteinexpression primär cerebraler und systemischer EBV-assoziiertes PTLD

Die Ergebnisse der Real-time PCR haben gezeigt, dass primär cerebrale und systemische EBV-assoziierte PTLD überwiegend alle untersuchten latenten und lytischen viralen Proteine exprimieren. EBNA3A und BRLF1 haben sich in beiden Gruppen als die am stärksten, LMP1 und BZLF1 als die am schwächsten exprimierten Proteine herausgestellt. Das relative Expressionsniveau ist in beiden Gruppen ausgesprochen heterogen (Abbildung 2) und

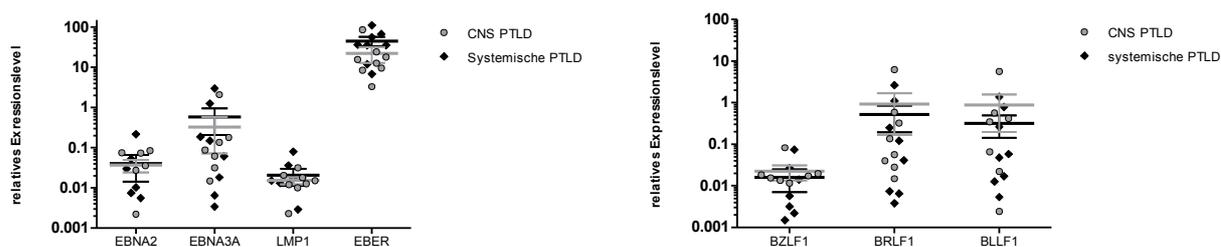


Abbildung 2. Vergleichende logarithmische Darstellung der mittleren Expression und des Standardfehler des Mittels latenter und lytischer Proteine und des EBERs EBV-assoziiierter pCNS PTLD und sPTLD. Keine Signifikanzen.

es konnte kein statistisch signifikanter Unterschiede im Expressionsniveau latenter und lytischer Proteine zwischen primär cerebralen und systemischen PTLD festgestellt werden (Tabelle 7).

Parameter	Mittel \pm SEM pCNS PTLD	Mittel \pm SEM sPTLD	p-Wert
EBNA2A	0,03705 \pm 0,01263	0,04105 \pm 0,02584	0,9591
EBNA3A	0,3256 \pm 0,2537	0,5817 \pm 0,3727	0,7984
LMP1	0,01524 \pm 0,003026	0,02063 \pm 0,009421	0,9581
EBER	22,32 \pm 9,482	45,38 \pm 11,90	0,1304
BZLF1	0,02225 \pm 0,008874	0,01594 \pm 0,008875	0,2933
BRLF1	0,9184 \pm 0,7522	0,5197 \pm 0,3275	0,5737
BLLF1	0,8765 \pm 0,6783	0,3218 \pm 0,1783	0,8785

Tabelle 7. Tabellarische Darstellung der Ergebnisse des Vergleichs des relativen Expressionslevels latenter und lytischer Proteine der pCNS PTLD und sPTLD. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittels, sowie die p-Werte, die keine signifikanten Unterschiede des relativen Expressionslevels der untersuchten Proteine abbilden.

3.3. Ergebnisse der microRNA Microarray-Analysen

3.3.1. MicroRNA Expression cerebraler und systemischer PTLD

Durch das microRNA Microarray wurde die microRNA Expression von 9 cerebralen sowie 8 EBV-assoziierten und 8 nicht EBV-assoziierten systemischen PTLD untersucht. Von den insgesamt 1223 humanen, 44 viralen (EBV) und allen anderen menschlichen viralen microRNAs der Sanger Datenbank, die durch das microRNA Microarray erfasst wurden, waren nach der Normalisierung insgesamt 569 microRNAs durch cerebrale/systemische PTLD exprimiert.

Von den 569 exprimierten microRNAs zeigt Tabelle 8 die 25 jeweils am stärksten exprimierten microRNAs systemischer und cerebraler PTLD. Von diesen 25 microRNAs werden übereinstimmend, jedoch unabhängig vom Stellenwert, die 18 microRNAs hsa-let-7a, hsa-let-7b, hsa-let-7f, hsa-let-7i, hsa-miR-1202, hsa-miR-1207-5p, hsa-miR-1225-5p, hsa-miR-1246,

hsa-miR-1274b, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-155, hsa-miR-16, hsa-miR-1915, hsa-miR-21, hsa-miR-451, hsa-miR-494, hsa-miR-638, hsa-miR-720 sowohl in EBV-assoziierten und nicht EBV-assoziierten, primär cerebralen wie systemischen PTLD exprimiert.

Rang	Nicht EBV-assoziierte sPTLD		EBV-assoziierte sPTLD		Primär cerebrale PTLD	
	microRNA	Mittel+-SEM	microRNA	Mittel+-SEM	microRNA	Mittel+-SEM
1	hsa-miR-21	14,09±0,2325	hsa-miR-21	14,23±0,3365	hsa-miR-21	13,05±0,5722
2	hsa-miR-494	13,12±0,3095	hsa-miR-720	13,23±0,2361	hsa-miR-720	12,34±0,3547
3	hsa-miR-720	12,67±0,3503	hsa-miR-142-3p	12,23±0,4918	hsa-miR-494	12,28±0,6332
4	hsa-miR-1274b	12,01±0,2920	hsa-miR-1246	12,22±0,5277	hsa-miR-451	12,20±0,5873
5	hsa-miR-142-3p	11,80±0,4623	hsa-miR-494	12,20±0,6766	hsa-miR-1246	12,17±0,5929
6	hsa-let-7f	11,70±0,1868	hsa-miR-1274b	12,06±0,2026	hsa-miR-1225-5p	11,92±0,4739
7	hsa-miR-16	11,61±0,1413	hsa-miR-155	11,86±0,5758	hsa-miR-1207-5p	11,46±0,4118
8	hsa-let-7a	11,54±0,2528	hsa-let-7f	11,54±0,3453	hsa-miR-1202	11,17±0,4545
9	hsa-miR-1246	11,18±0,5386	hsa-let-7a	11,29±0,2998	hsa-miR-630	11,05±0,8143
10	hsa-miR-1915	10,85±0,3636	hsa-miR-1202	11,19±0,3637	hsa-miR-1290	10,90±0,7005
11	hsa-miR-23a	10,82±0,2732	hsa-miR-1225-5p	11,08±0,3493	hsa-let-7a	10,87±0,4749
12	hsa-miR-1225-5p	10,67±0,3122	hsa-miR-16	11,04±0,2913	hsa-miR-638	10,85±0,4945
13	hsa-miR-638	10,63±0,3531	hsa-miR-1207-5p	10,68±0,3055	hsa-miR-1274b	10,83±0,5000
14	hsa-miR-451	10,52±0,8665	hsa-miR-638	10,67±0,4800	hsa-let-7f	10,75±0,4903
15	hsa-let-7i	10,43±0,2396	hsa-miR-451	10,65±0,8020	hsa-miR-1915	10,71±0,3256
16	hsa-miR-1207-5p	10,39±0,2644	hsa-miR-1915	10,60±0,4124	hsa-miR-155	10,58±0,5640
17	hsa-miR-1202	10,36±0,3767	hsa-miR-23a	10,39±0,4459	hsa-miR-142-3p	10,50±0,5226
18	hsa-miR-15b	10,31±0,1890	hsa-miR-1290	10,39±0,6116	hsa-miR-16	10,25±0,4059
19	hsa-let-7g	10,19±0,2448	hsa-let-7g	10,29±0,4109	kshv-miR-K12-3	9,86±0,4111
20	hsa-let-7b	10,15±0,3381	hsa-let-7i	10,25±0,4487	hsa-let-7b	9,83±0,3518
21	hsa-miR-20a	10,02±0,3668	hsa-miR-1260	10,25±0,3723	hsa-miR-1268	9,67±0,3513
22	hsa-miR-1260	9,98±0,4936	hsa-miR-146a	9,99±0,7829	hsa-let-7i	9,63±0,4301
23	hsa-miR-29a	9,90±0,2170	hsa-let-7b	9,76±0,3372	hsa-miR-575	9,62±0,4479
24	hsa-miR-19b	9,76±0,4049	ebv-miR-BART1-3p	9,65±0,4858	hsa-miR-320c	9,54±0,5570
25	hsa-miR-155	9,71±0,5182	hsa-miR-15b	9,62±0,2573	hsa-miR-1275	9,54±0,5734

Tabelle 8. Auflistung der 25 am stärksten relativ exprimierten microRNAs systemischer EBV-assoziiierter und –nicht assoziierter systemischer und cerebraler PTLD. sPTLD=systemische PTLD, SEM=Standard Fehler des Mittels.

Unabhängig von einer EBV-Assoziation wird hsa-miR-21 durch alle PTLD am stärksten exprimiert. Neben dieser microRNA, die in den verschiedensten Karzinomen überexprimiert wird, findet sich auch die für das DLBCL typische hsa-miR-155 unter den top 25 (grau). Die relative Expression von hsa-miR-155 nimmt in den verschiedenen Gruppen des PTLD aber einen unterschiedlichen Stellenwert ein: so ist sie in systemischen nicht EBV-assoziierten PTLD an 25. Stelle, in den systemischen EBV-assoziierten PTLD an 7. Stelle und bei den primär cerebralen PTLD an 16. Stelle zu finden. Der absolute Unterschied ist allerdings gering und nicht signifikant (siehe unten). Gleiches gilt für 16 weitere in der Tabelle in „schwarz“ und „fett“ markierten microRNAs. Nur in den systemischen nicht EBV-assoziierten PTLD findet sich hsa-miR-19b (violett) als Teil des mit dem DLBCL assoziierten miR-17-92 Clusters überhaupt unter

den 25 meistexprimierten microRNAs. Die microRNA hsa-miR-1290 findet sich nur bei den primär cerebralen und den systemischen EBV-assoziierten PTLD in der Liste der Top 25 (grün) und zwar an der 9. bzw. 18. Position. Daneben gibt es insgesamt 6 microRNAs (blau), die lediglich bei den primär cerebralen PTLD in der Liste der Top 25 auftauchen. Neben humanen microRNAs ist hier eine weitere virale microRNA vertreten: die HHV-8 spezifische microRNA kshv-miR-K12-3. Wenn man die gesamte Liste aller EBV-assoziierten wie nicht EBV-assoziierten systemischen PTLD betrachtet, ist die Expression dieser microRNA in allen Gruppen vorhanden (wenngleich schwächer, dennoch nicht signifikant). Vermutlich handelt es sich hier letztlich aber um eine unspezifische Bindung.

3.3.2. Unhierarchisches Clustering cerebraler und systemischer PTLD

Um ein microRNA-Expressionsprofil systemischer und cerebraler PTLD bestimmen zu können, wurde nachfolgend ein unhierarchisches Clustering der 569 exprimierten microRNAs durchgeführt.

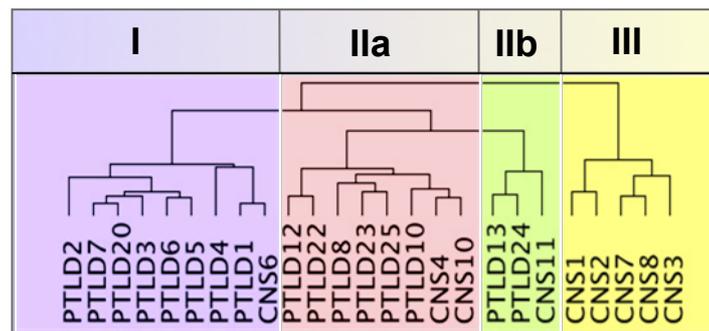


Abbildung 3. Darstellung primär cerebraler und systemischer PTLD nach unhierarchischem Clustering. Deutlich zu erkennen ist die Bildung dreier Gruppen I-III, sowie der Untergruppe IIa und IIb.

Die Gruppe I entspricht der Gruppe der nicht EBV-assoziierten PTLDs und schließt neben den 8 systemischen EBV-negativen PTLD auch den einen Fall des nicht EBV-assoziierten primär cerebralen PTLD (CNS 6) mit ein. In der Gruppe II finden sich alle systemischen EBV-assoziierten PTLD wieder, sowie 3 der 8 EBV-assoziierten primär cerebralen PTLD: CNS 4, CNS 10 und CNS 11. Deutlich wird, dass die PTLD dieser Gruppe zwei Untergruppen, IIa und IIb, bilden. Die restlichen 5 EBV-assoziierten primär cerebralen PTLD clustern allein und bilden so die Gruppe III (CNS 1, CNS 2, CNS 7, CNS 8, CNS 3). Verfolgt man den ersten Arm des Clusters, so kann festgestellt werden, dass die Gruppe III letztlich den Gruppen I und II gegenüber steht. Systemische EBV-assoziierte und systemische nicht EBV-assoziierte PTLD

weisen damit zueinander mehr Gemeinsamkeiten auf als zu dieser Gruppe primär cerebraler EBV-assoziiertes PTLD.

Die Gruppe I (alle nicht EBV-assoziierten PTLD), zeigt keine bzw. eine vereinzelt schwache Expression der viralen microRNAs des Epstein-Barr Virus. Diese fehlende/schwache Expression viraler EBV-microRNAs, bedingt hauptsächlich ihr separates Clustering (Abbildung).

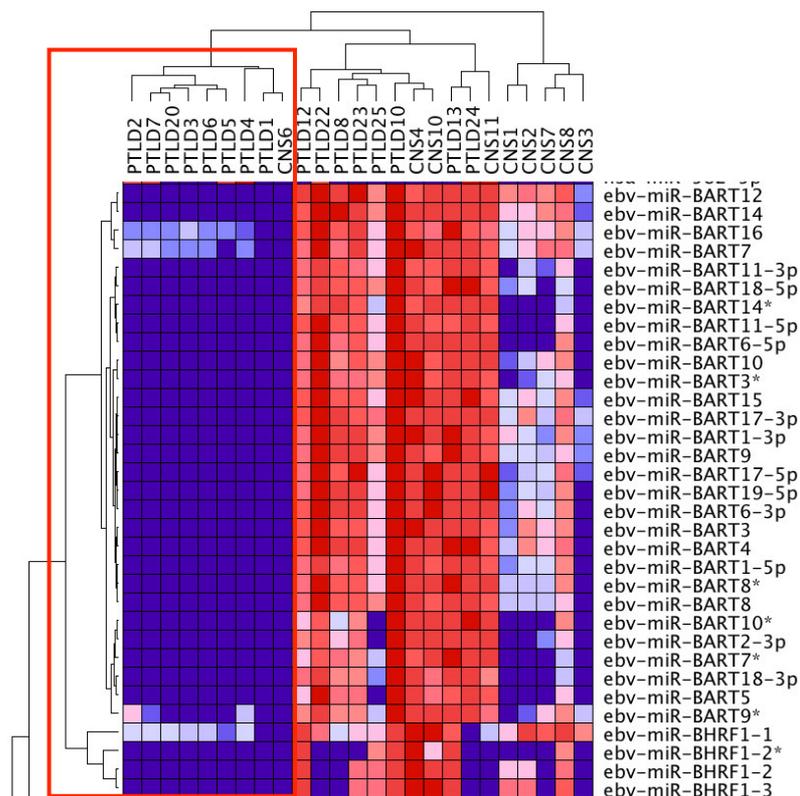


Abbildung 13. Ausschnitt des unhierarchischen Clusterings. Abgebildet ist das Cluster der viralen microRNAs des EBV, welches durch die Gruppe I nicht/schwach exprimiert wird und damit zu ihrer Separation von Gruppe II und III führt. Blau= fehlende/relativ schwache Expression, rot= relativ starke Expression.

Im umgekehrten Sinne ist die relativ starke Expression der EBV-spezifischen microRNAs, zusätzlich aber auch die ebenfalls sehr starke Expression eines microRNA Clusters bestehend aus hsa-miR-155, hsa-miR-146a, hsa-miR-221 und hsa-miR-222, verantwortlich für das Zusammenclustern aller systemischen EBV-assoziierten PTLD und eines Teils der cerebralen PTLD und damit für die Bildung der Gruppe II (Abbildung , Abbildung 4).

Die von den beiden Gruppe I und II abgegrenzte Gruppe III, welche die restlichen 5 der 8 EBV-assoziierten cerebralen PTLDs, aber keine systemischen PTLD enthält, zeigt eine im Vergleich

zu den Gruppen I und II deutlich abgeschwächte Expression mehrerer humaner und viraler microRNA Cluster.

Wie in Abbildung 4 ebenfalls deutlich wird, bilden die microRNAs hsa-miR-155, hsa-miR-146a, hsa-miR-221 und hsa-miR-222 ein gemeinsames Cluster, welches in den cerebralen PTLDs der Gruppe III nur schwach exprimiert wird. Dies ist bemerkenswert, da, insbesondere die Expression von hsa-miR-155, die über ihr Target SMAD5 die wachstumshemmenden Proteine TGF- β 1 und BMP negativ beeinflusst, regelhaft in Non-Hodgkin Lymphomen stark exprimiert gefunden wird [73, 89].

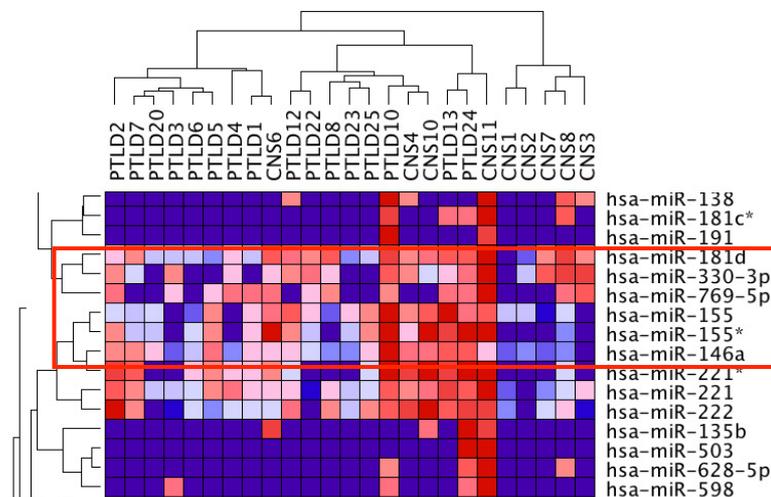


Abbildung 4. Ausschnitt des unhierarchischen Clusterings. Eingerahmt das microRNA Cluster der hsa-miR-155, hsa-miR-146a und hsa-miR-221/222, welches durch cerebrale PTLD der Gruppe III nur schwach exprimiert wird.

Ähnliches zeigt sich auch für die Expression des DLBCL-typischen microRNA Clusters MiR17-92, welches die sechs microRNAs hsa-miR-17, hsa-miR-18a, hsa-miR-19a, hsa-miR-19b, hsa-miR-20a und hsa-miR-92a umfasst (Abbildung 5).

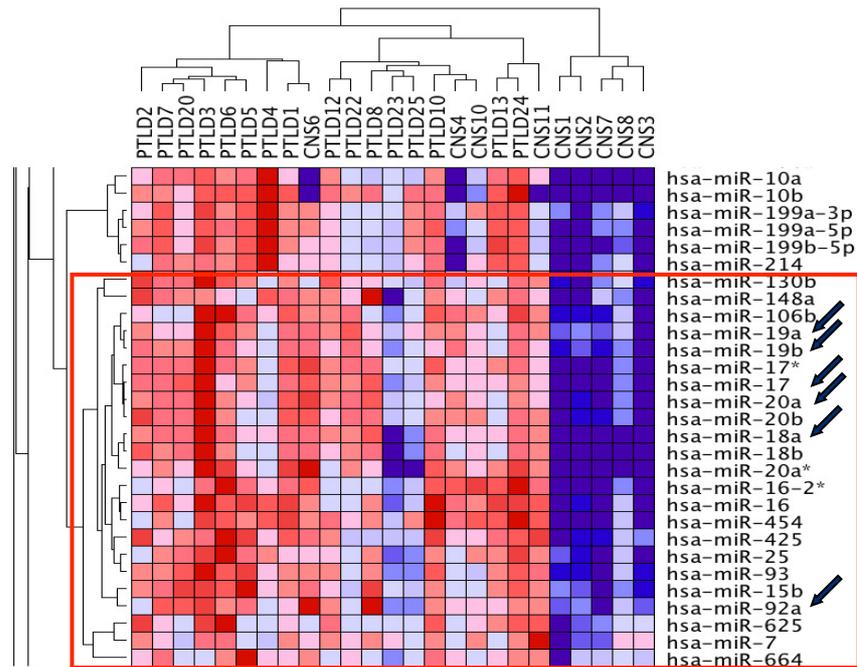


Abbildung 5 Ausschnitt des unhierarchischen Clusterings. Eigerahmt ein Cluster, welches das für das DLBCL typische micro-RNA Cluster miR-17-92 enthält. Die blauen Pfeile zeigen. Die im Cluster enthaltenen hsa-miR-17, hsa-miR-18a und hsa-miR-19a, hsa-miR-19b, hsa-miR-20a und hsa-miR-92a, werden durch cerebrale PTLD der Gruppe III schwächer exprimiert (blaue Pfeile).

Auch microRNA hsa-miR-21, deren Expression in NHL und DLBCL beschrieben wurde, ist in cerebralen PTLD der Gruppe III schwächer exprimiert, was erneut die Grenzen zu den PTLD der Gruppen I und II verdeutlicht (Abbildung 6).

Den Gruppen I und II gegenüber abgrenzend, zeigt sich auch die schwache Expression der Mitglieder, der hsa-let-7 Familie, die insgesamt 12 microRNAs (let-7-a1, a2, a3, b, c, d, e, f1, f2, g, I und miRNA-98) umfasst und die tumorsuppressive Eigenschaften aufweist, z.B. durch die Interaktion mit c-myc [90]. Abbildung 6 zeigt blau umrahmt die Minderexpression 8 der mit dem verwendeten microRNA Microarray untersuchten hsa-let-7 Mitglieder.

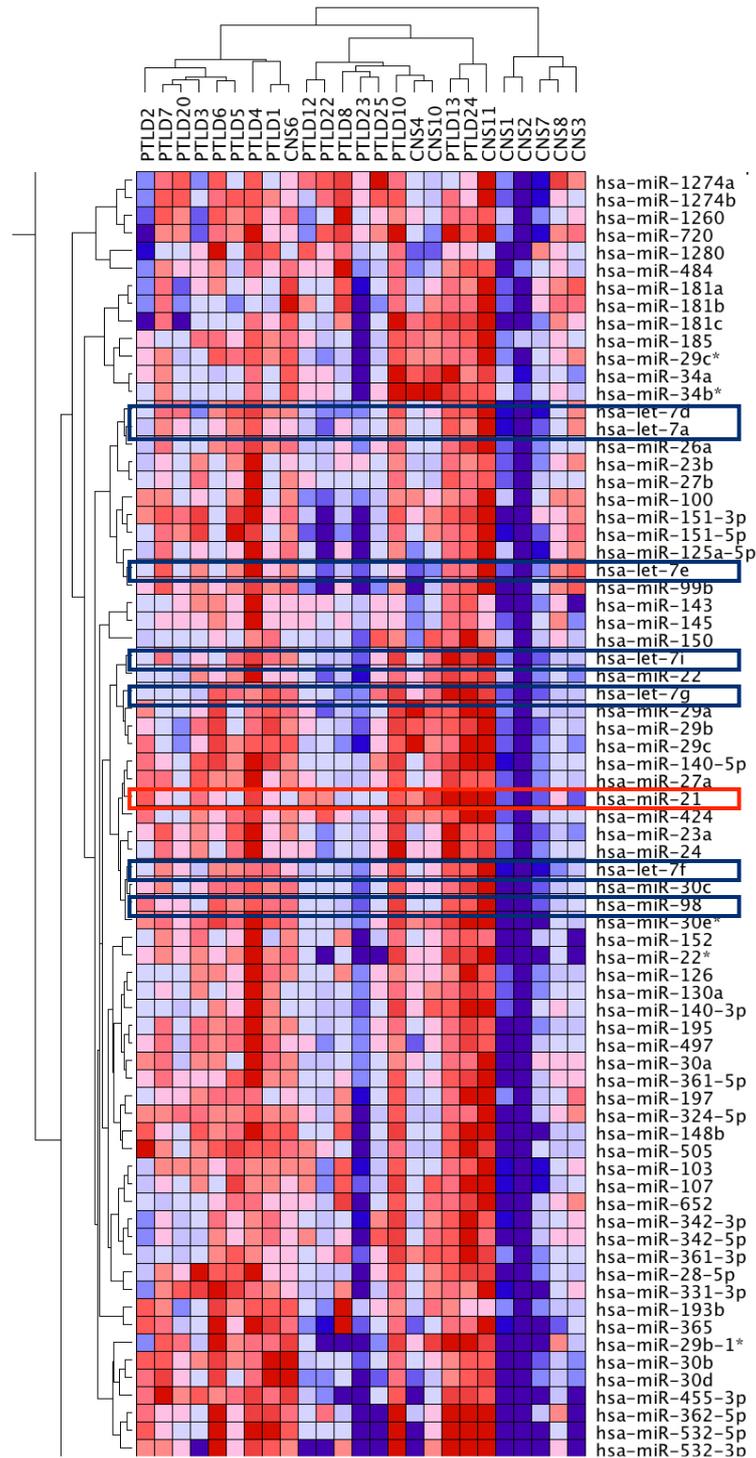


Abbildung 6. Ausschnittsweise Darstellung des unhierarchischen Clusters. Rot umrahmt hsa-miR-21, blau umrahmt Mitglieder der hsa-let-7 Familie, die durch cerebrale PTLD der Gruppe III schwächer exprimiert werden.

Ergänzend hierzu zeigt Tabelle 9, dass cerebrale PTLD der Gruppe III hsa-miR-494 am stärksten exprimieren, hsa-miR-21 jedoch nur die siebt stärkste relative Expression zeigt und hsa-let-7 sich nicht unter den 10 am stärksten exprimierten microRNAs wiederfindet.

Rang	CNS PTLD Gr. II		CNS PTLD Gr. III	
	microRNA	Mittel±SEM	microRNA	Mittel±SEM
1	hsa-miR-21	14,50±0,3675	hsa-miR-494	12,99±0,9469
2	hsa-miR-451	13,41±0,588	hsa-miR-1225-5p	12,73±0,3688
3	hsa-miR-720	12,81±0,4222	hsa-miR-1246	12,56±0,7337
4	hsa-miR-155	12,15±0,2147	hsa-miR-1207-5p	12,12±0,4242
5	hsa-miR-142-3p	12,06±0,2456	hsa-miR-630	12,04±0,8884
6	hsa-let-7f	12,00±0,5333	hsa-miR-720	11,96±0,5168
7	hsa-let-7a	11,75±0,6709	hsa-miR-21	11,88±0,58
8	hsa-miR-1274b	11,70±0,5524	hsa-miR-638	11,81±0,5335
9	hsa-miR-1246	11,69±1,036	hsa-miR-1202	11,79±0,2703
10	hsa-miR-16	11,45±0,114	hsa-miR-1915	11,38±0,2608

Tabelle 9. Auflistung der Mittel und des Standardfehler des Mittels der 10 relativ am stärksten exprimierten microRNAs der cerebralen PTLD der Gruppe II und III. Gr.=Gruppe, SEM=Standardfehler des Mittels

Das unhierarchische Clustering zeigt, neben der Einteilung in die Gruppen I-III, eine Subgruppenbildung der Gruppe II (IIa und IIb). Abbildung 7 zeigt ein diese Unterteilung maßgeblich bestimmendes Cluster von microRNAs, welches durch die PTLD der Gruppe IIb deutlich stärker exprimiert wird. Deutlich werden die subgruppenbildenden Unterschiede auch in Abbildung 6, hsa-mir-21 wird hier durch die Gruppe IIa schwächer exprimiert.

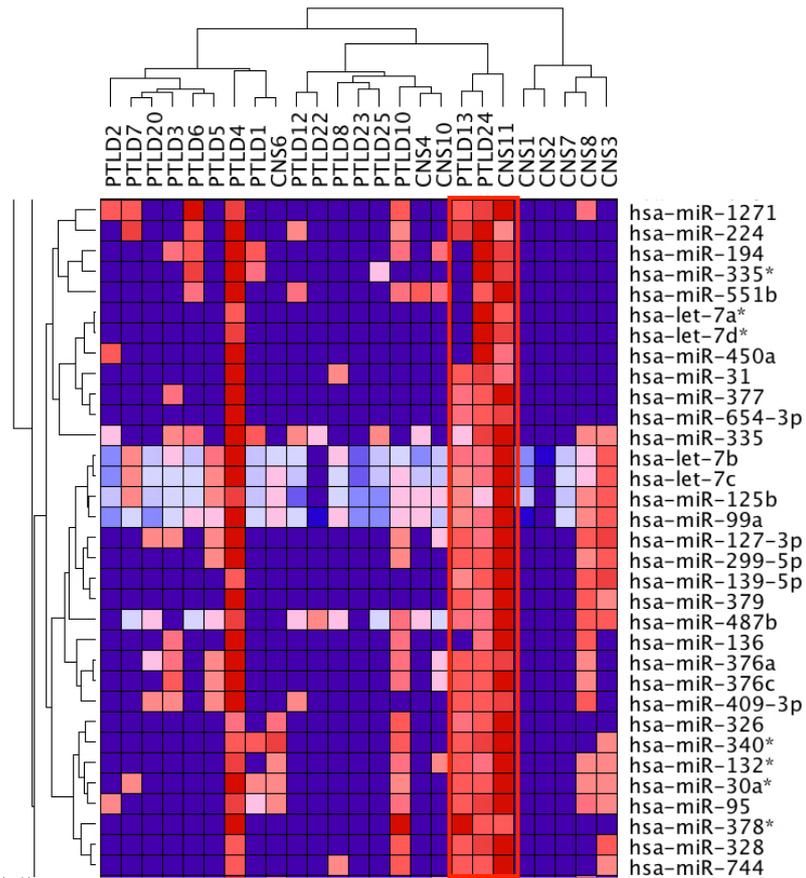


Abbildung 7 Ausschnittsweise Darstellung des unhierarchischen Clusters. Rot umrahmt ist ein microRNA Cluster, welches u.a. die Unterteilung der Gruppe II bedingt und durch die Gruppe IIb relativ stark exprimiert wird.

3.3.3. Vergleich der microRNA Expression primär cerebraler und systemischer PTLD

Das unhierarchische Clustering primär cerebraler und systemischer PTLD anhand ihrer humanen und human viralen microRNA Expression hat zur Definition von drei Gruppen geführt. 5 von 9 primär cerebraler PTLD bilden hierbei eine eigene Gruppe, die sich durch eine relativ verminderte Expression der an sich für Karzinome, das DLBCL und LCL typische microRNAs auszeichnet. In Ergänzung zum unhierarchischen Clustering können durch die Definition vorgegebener Gruppen (systemische PTLD vs. cerebrale PTLD) zusätzliche Erkenntnisse gewonnen werden. Der Vergleich der microRNA-Expression der beiden vorgegebenen Gruppen erfolgt dann einzeln für alle microRNAs mittels t-Test. Als signifikant stärker oder schwächer exprimiert wird eine microRNA angenommen, deren Falschpositivrate kleiner als 0,05 ist.

Die Ergebnisse der t-Teste und des sich hierdurch ergebenden Clusterings sind in Abbildung dargestellt. Hier zeigt sich, dass 7 von 9 primär cerebralen PTLD zusammen ein Cluster bilden und damit allen systemischen PTLD, CNS 10 und CNS 6 gegenüber stehen. Dabei zeichnen sich die cerebralen PTLD, mit Ausnahme von CNS 10, durch die gesteigerte Expression von

lediglich zwei microRNAs aus, den gehirnspezifisch exprimierten microRNAs hsa-mir-124 und hsa-miR-219-5p [91].

Untereprimiert gegenüber den systemischen PTLD, finden sich in cerebralen PTLD, mit Ausnahme von CNS 6 und CNS 10, insgesamt neun microRNAs (hsa-miR-10b, hsa-miR-10a, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-214, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-130b, hsa-miR-143, hsa-miR-145).

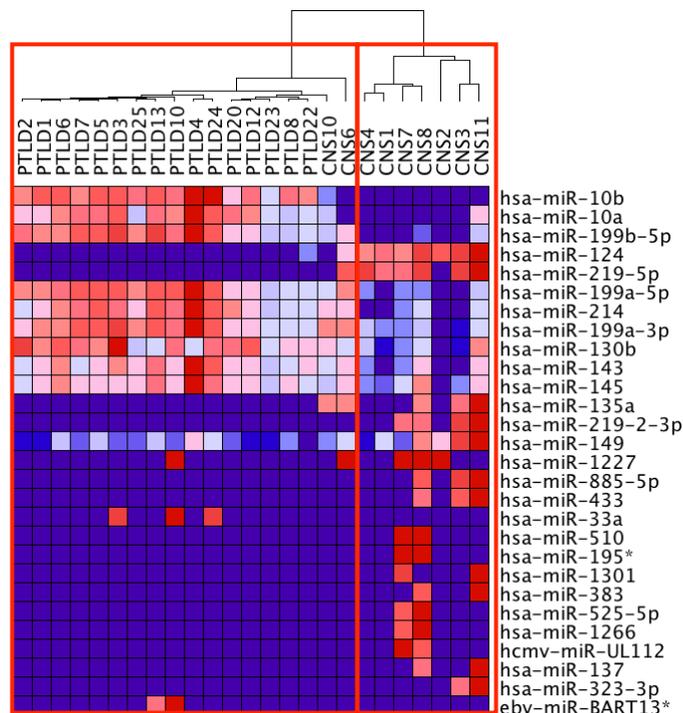


Abbildung 18. Vergleich der microRNA-Expression (t-Test) von pCNS PTLD und sPTLD und Darstellung der Ergebnisse (wenn FDR <0,05) als unhierarchisches Clustering. Rot umrahmt die zwei separat clusternden Gruppen von EBV^{+/-} sPTLD/pCNS PTLD und EBV⁺ pCNS PTLD.

7 Proben der 9 cerebralen PTLDs enthalten also eine gewisse „Kontamination“ von Hirngewebe. Dies betrifft primär cerebrale PTLDs aller drei unhierarchien Cluster und ist daher nicht der Grund der oben beschriebenen Separierung cerebraler PTLDs in die Cluster II und III. Wie in Kapitel 3.3.2 dargestellt beruhte das Clustering auf gänzlich anderen als den beiden gehirnspezifisch exprimierten microRNAs hsa-mir-124 und hsa-miR-219-5p (s.o.).

3.3.4. Vergleich der microRNA-Expression EBV-assoziiierter primär cerebraler und systemischer PTLD

Die analoge Auswertung des t-Tests zum Vergleich der microRNA Expression EBV-assoziiierter primär cerebraler PTLD mit den EBV-assoziierten systemischen PTLD ergab unter der Berücksichtigung der False Discovery Rate, des p-Wertes und des FWER (familywise error rate), nur einen signifikanten Unterschied: eine ca. 24-fach stärkere Expression von hsa-miR-124 in primär cerebralen PTLD (Tabelle 10).

Rang		microRNA	p	FDR	FWER	Fold	Mittel pCNS	Mittel sPTLD
1	CNS	hsa-miR-124	0,0040	0,1304	0,0310	24,1661	6,4582	0,2672
2	CNS	hsa-miR-92b	0,0060	0,1806	0,1010	3,1607	2,3347	0,7387
3	PTLD	hsa-miR-10b	0,0080	0,2158	0,1270	4,4604	1,3700	6,1109
4	CNS	hsa-miR-219-5p	0,0339	0,3855	0,2160	39,8732	3,9873	0,1000
5	CNS	hsa-miR-486-5p	0,0080	0,2158	0,3010	1,3168	6,4733	4,9161
6	PTLD	ebv-miR-BART18-5p	0,0140	0,2547	0,3010	2,1858	4,0406	8,8319
7	PTLD	ebv-miR-BART11-5p	0,0180	0,2817	0,3230	2,5532	2,1760	5,5558
8	PTLD	ebv-miR-BART22	0,0080	0,2158	0,3490	1,8174	5,4079	9,8283
9	PTLD	ebv-miR-BART9	0,0180	0,2817	0,3500	1,7082	5,0543	8,6339
10	CNS	hsa-miR-129*	0,0100	0,2347	0,3670	2,9722	3,6161	1,2166

Tabelle 10. Darstellung der Ergebnisse des Vergleichs humaner und viraler microRNAs EBV assoziierter primär cerebraler PTLD vs. systemischer PTLD durch den t-Test. FDR= False Discovery Rate, sPTLD=systemische PTLD, pCNS= cerebrale PTLD, FWER=familywise error rate.

Bei hsa-miR-124 handelt es sich um eine, wie bereits oben beschriebene, gehirnspezifisch exprimierte micro-RNA.

Relevante zusätzliche Informationen konnten durch die Gruppendifinitionen „(EBV-assoziierte) primär cerebrale“ versus „(EBV-assoziierte) systemische PTLD“ somit nicht gewonnen werden. Angesichts der Tatsache, dass ein Teil der primär cerebralen PTLD im unhirarchischen Clustering mit den systemischen PTLD zusammen clustert, ist dieses Ergebnis nicht unerwartet.

3.3.5. Unhierarchisches Clustering EBV-spezifischer microRNAs cerebraler und systemischer PTLD

Das unhierarchische Clustering bei ausschließlicher Betrachtung der exprimierten microRNAs des Epstein-Barr Virus der primär cerebralen und systemischen PTLD, zeigt ebenfalls drei Cluster.

Auffällig ist, dass die microRNAs, ebv-miR-BART-13, ebv-miR-BART-20-3p und ebv-miR-BART-20-5p nur durch PTLD 10, PTLD 13 und PTLD 22 exprimiert werden. Weiter zeigt sich, dass das microRNA-Cluster, bestehend aus ebv-miR-BART-13 und ebv-miR-BART-19-3p durch alle PTLD, schwach bis stark exprimiert wird. Die Expression dieses Clusters, lässt sich auch unter den nicht EBV-assoziierten PTLD, mit Ausnahme von PTLD 1, finden und deutet am ehesten auf eine unspezifische Bindung anderer microRNAs hin.

Die nicht EBV-assoziierten systemischen PTLD, wie auch das nicht EBV-assoziierte cerebrale PTLD CNS 6, finden sich innerhalb des ersten Clusters, welches sich durch das weitestgehende Fehlen einer viralen microRNA Expression auszeichnet. Dennoch, auch das cerebrale PTLD CNS 3, welches eine, wenn auch äußerst schwache Expression mehrere microRNAs zeigt, wird diesem Cluster zugeordnet. Es scheint, als könne, trotz vorhandener latenter und lytischer Proteinexpression, eine virale microRNA Expression weitgehend fehlen.

Das unhierarchische Clustering zeigt daneben zwei weitere Cluster, denen alle EBV-assoziierte systemischen und cerebralen PTLD (ausgenommen CNS 3) zugeordnet werden können. Diese Cluster haben Ähnlichkeiten zu den Clustern die sich unter Berücksichtigung der humanen microRNAs ergaben, sind aber nicht deckungsgleich. Ähnlich ist, dass die primär cerebralen PTLD CNS 4, CNS 10 und CNS 11 mit den systemischen EBV-assoziierten PTLD gemeinsam clustern und damit getrennt von den cerebralen PTLDs CNS 1, CNS 2, CNS 7 und CNS 8. Ein deutlicher Unterschied hingegen ist, dass, bezogen auf die EBV-microRNA-Expression, die systemischen PTLD 12 und 25 eine gewisse Ähnlichkeit zu den cerebralen PTLD aufweisen, die damit keine separate Gruppe bilden.

PTLD, die dem Cluster II angehören, zeigen allgemein eine deutlich schwächere virale microRNA Expression, als jene des Clusters III. Die PTLD dieses Clusters zeichnen sich zudem durch ein vollständiges Fehlen der ebv-miR-BART2-5p aus, einer microRNA von der bekannt ist, dass sie die Expression der viralen DNA Polymerase BALF5 beeinflusst [92]. Zudem werden zwei microRNA Cluster z.T. nur schwach bzw. gar nicht exprimiert (siehe Abbildung). Zum einen ist dies das Cluster der microRNAs ebv-miR-BART11-3p, ebv-miR-BART18-5p, ebv-miR-BART14*, ebv-miR-BART11-5p und ebv-miR-BART6-5p.

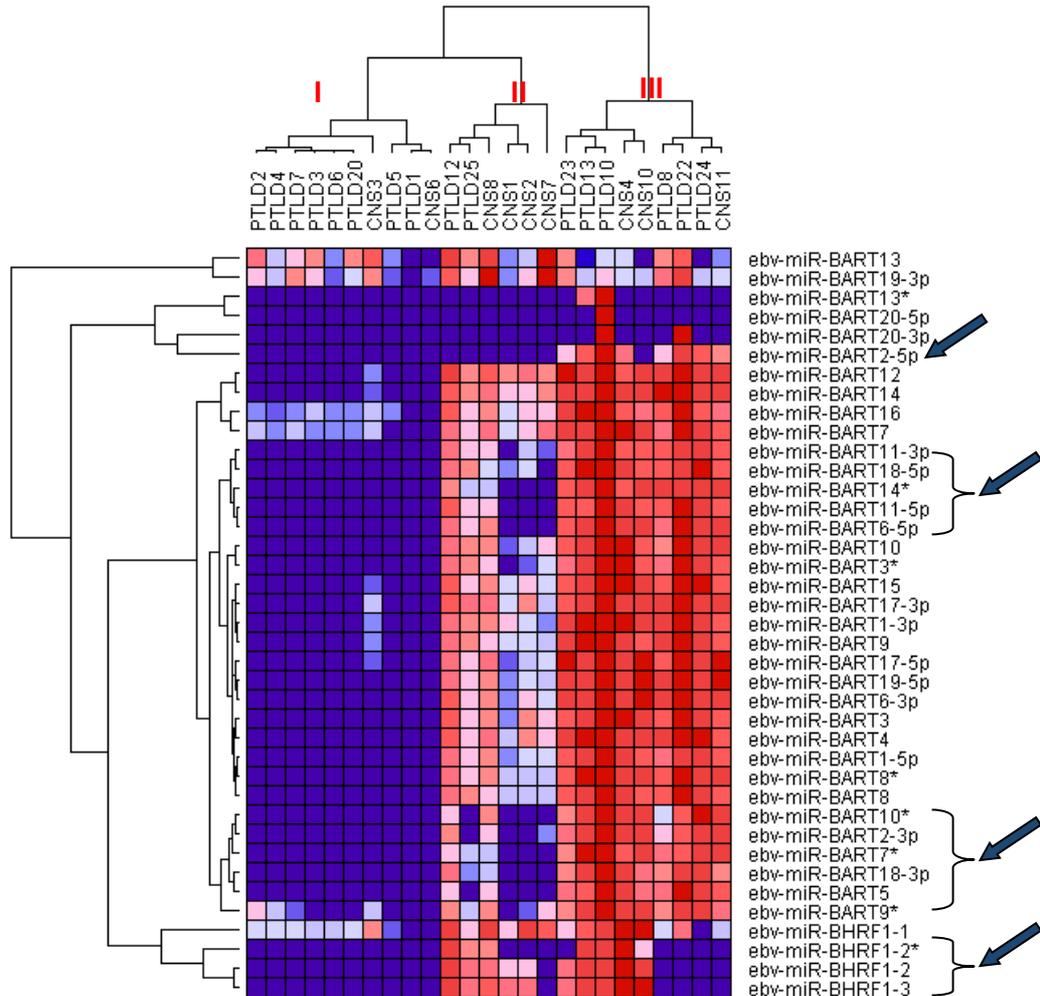


Abbildung 19. Unhierarchisches Cluster der systemischen und primär cerebralen PTLD anhand ihrer viralen microRNA Expression und Darstellung der Cluster I, II und III. Pfeile weisen auf die unterschiedlich exprimierte microRNA Cluster hin.

Bekannt ist derzeit lediglich die Funktion einer dieser microRNAs, ebv-miR-BART6-5p, dessen Zielstruktur Dicer ist und dass eine gesteigerte Expression dieser microRNA die Expression lytischer und latenter Proteine (insbesondere EBNA2) inhibiert [93].

Zum anderen wird das Cluster, bestehend aus ebv-miR-BART10*, ebv-miR-BART2-3p, ebv-miR-BART7*, ebv-miR-BART18-3p und ebv-miR-BART5 und ebv-miR-BART9* schwach bzw. nicht exprimiert. Aus diesem Cluster ist die Funktion der microRNA ebv-miR-BART5 bekannt, deren Expression antiapoptotisch wirkt. Zielstruktur dieser microRNA das zelluläre Protein „p53 up-regulated modulator of apoptosis“ (*PUMA*) [84]. Insbesondere die cerebralen PTLD des Clusters II zeigen, bis auf CNS 8 eine fehlende Expression dieser beiden microRNA Cluster.

Das Cluster III zeigt eine starke Expression der meisten microRNAs. Anders als im Cluster II, zeigen alle PTLD dieses Clusters, mit Ausnahme von CNS 10, eine Expression der ebv-miR-BART2-5p. Auch die im Cluster II schwach exprimierte microRNA Cluster, erscheinen hier

stark exprimiert. Deutlich lassen sich in diesem Cluster zwei Untergruppen erkennen. Diese unterscheiden sich durch das Vorhandensein bzw. teilweise Fehlen des microRNA Clusters der microRNAs ebv-miR-BHRF1-1, ebv-miR-BHRF1-2, ebv-miR-BHRF1-2* und ebv-miR-BHRF1-3. Dieses Cluster wird durch PTLD 8, PTLD 22, PTLD 24 und CNS 11 nur unvollständig exprimiert. Von diesem microRNA Cluster ist bekannt, dass bei dessen Expression die Transformation und Koloniebildung der B-Zelle verstärkt wird und bei dessen fehlender Expression auch nur einer der microRNAs des BHRF1 Clusters diese Tendenz bis zu 50% reduziert wird [83, 94]. Als Zielstruktur von ebv-miR-BHRF1-3 gilt ein Chemokin, CXCL-11/I-TAC, welches T-Zellen anlockt [95].

4. Diskussion

4.1 Expression latenter und lytischer Gene

Transplantations-assoziierte lymphoproliferative Erkrankungen sind eine schwerwiegende Komplikation nach Stammzell- und Organtransplantation. Die EBV-Assoziation der PTLD erwachsener Organtransplantierter beträgt etwa 40-50% [17]. Die ausschließlich das zentrale Nervensystem befallende primär cerebrale PTLD ist ein seltener Subtyp in der PTLD-Familie und in etwa 90% der Fälle EBV-assoziiert [37, 96]. Die Expression latenter und lytischer Proteine beeinflusst die Pathogenese. Während der latenten Phase einer Epstein-Barr Virus Infektion ist es dem Virus möglich, bis zu neun latente Proteine, darunter sechs nukleare Antigene (EBNA1, -2, -3A, -3B, -3C, -LP), zwei latente Membranproteine (LMP1, LMP2) und die nicht translatierten kleinen RNAs EBER1 und EBER2 zu exprimieren. Die vollständige Expression aller latenten Proteine sowie von EBER 1 und EBER2 wird auch als „growth program“ oder Latenztyp III bezeichnet und wurde bei EBV-assoziierten DLBCL und im Rahmen einer infektiösen Mononukleose beschrieben. Die Latenztypen I und II kennzeichnen eine restringierte Expression von Latenzgenen und sind mit dem Burkitt-Lymphom (isolierte EBNA1-Expression, Latenztyp I) und dem Hodgkin-Lymphom (isolierte LMP1 und LMP2 Expression, Latenztyp II) assoziiert. Durch den quantitative Nachweis von LMP1, ENBA2 und EBNA3A konnten wir in dieser Arbeit zeigen, dass sowohl systemische wie primär cerebrale PTLD mehrheitlich einen Latenztyp III zeigen wobei die ermittelten Daten zu den systemischen PTLD in Übereinstimmung zu den Ergebnissen anderer Gruppen stehen [97].

Die auf die Proteine EBNA1, LMP1 und EBER limitierte Expression zweier cerebraler PTLD, konnte als Ausnahme vom vorherrschenden Latenzmuster identifiziert werden. Allgemein sind die nur ein limitiertes Repertoire latenter Proteine zeigende PTLD selten, aber in all den hier gefundenen Formen bereits in systemischen PTLD beschrieben worden und damit möglicher Weise als gewöhnliche Variation innerhalb der PTLD zu verstehen [98].

Auch bezüglich des Expressionsniveaus der verschiedenen Latenzproteine zeigen primär cerebrale und systemische PTLD starke Ähnlichkeiten. In beiden Gruppen wird das latente Protein EBNA-3A stärker exprimiert als EBNA2 und LMP1. LMP1 wird in beiden Gruppen am schwächsten exprimiert. EBNA-3A, das zusammen mit EBNA-3B und EBNA-3C eine Familie nukleärer Antigene bildet, ist essentiell für die Immortalisierung von B-Zellen und deren Transformation, die bei mutiertem, funktionsunfähigem EBNA-3A deutlich eingeschränkt ist [99]. Die starke und konstante Expression dieses Proteins könnte auf eine wichtige Funktion dieses Latenzgens in der Pathogenese systemischer wie cerebraler PTLD hinweisen. So könnte

EBNA-3A über die Inhibition des Proteins „Bcl-2-interacting mediator of cell death“ *Bim*, einem Mitglied der BCL-2 Familie, dessen proapoptotische Funktionen herunter regulieren [100]. Auch eine verminderte Expression des Tumorsuppressors p16INK4A wird mit EBNA-3A in Verbindung gebracht. Hinzu kommt, dass EBNA-3A unabdingbar für die fortlaufende Proliferation von EBV-immortalisierten B-Zellen in vitro (LCL) ist [101]. Andererseits sind bei starker Überexpression von EBNA-3A eine Repression von c-myc, CD21 und CD23 und ein Arrest von EBV-transformierten LCL in der G0/G1-Phase beschrieben worden [102]. Dies erfolgt durch eine Interaktion mit RBP-Jk, über welches EBNA2 die Expression von c-myc und die Promotoren aller sechs nukleären EBV-Antigene (*Cp* Promotor) sowie den LMP1-Promotor aktivieren kann [103]. Auch EBNA-3A bindet RBP-Jk, führt dabei aber nicht zu einer Aktivierung. Die damit verbundene Mindereexpression von EBNA2 und LMP1 ist abhängig vom EBNA-3A Expressionslevel und könnte somit Ursache der geringen Expressionslevel von EBNA2 und LMP1 in einigen der untersuchten PTLD sein [101, 104]. Wie von *Maruo et al.* vorgeschlagen, könnte die damit einhergehende Mindereexpression von c-myc vor dessen proapoptotischer Wirkung schützen. So treten LCL ohne Expression von EBNA-3A mit vorhandener c-myc Expression in den Zellarrest ein und aktivieren apoptotische Vorgänge. LCL mit Überexpression von EBNA-3A und fehlender c-myc Expression treten ebenfalls in den Zellarrest ein, Apoptose findet aber nicht statt, solange c-myc nicht aktiviert wird [101].

Die Replikation des Epstein-Barr Virus und die damit einhergehende Expression der über 100 verschiedenen lytischen Proteine wird typischer Weise in Epithel- und B-Zellen bei der erstmaligen Infektion mit dem Virus beobachtet [105]. Dabei werden zunächst Immediate Early-Antigene, wie BZLF1 und BRLF1, anschließend early-Antigene und schließlich late lytic-Antigene, wie das Oberflächenprotein BLLF1, exprimiert, um schließlich durch Lyse der Zelle neue Viren frei zu setzen. Die Reaktivierung der lytischen Replikation einer latent infizierten Zelle ist selten und sichtbar nur im Krankheitsbild der oralen Haarleukoplakie, die zumeist bei Immundefizienz auftritt [106]. In der lymphoblastoiden Ziellinie *LCL*, die nach der Infektion mit EBV eine Immortalisierung und Transformation zeigt und als Zelllinienmodell des PTLD gilt, zeigen ~5% der Zellen eine lytische Aktivität. Hierzu korrespondierend konnten Studien an Gewebematerial monomorpher PTLD den immunhistochemischen Nachweis einer Expression des BZLF1 Proteins in der überwiegenden Mehrzahl der Proben (zwischen 78-95%) erbringen. Allerdings wird auch hier BZLF1 nur in einem sehr kleinen Teil der EBV-infizierten B-Zellen gefunden (<<5%) [107-109]. In Einklang damit stehen die Ergebnisse dieser Arbeit, in der eine Expression des lytischen Antigens BZLF1 in 7/8 Proben systemischer und 7/8 Proben cerebraler PTLD nachgewiesen wurden. Mit der gleichzeitig erfassten Expression von BRLF1 und BLLF1 scheint ein komplettes Durchlaufen des lytisch replikativen Zyklus in 7/8 systemischen und 6/8 cerebralen PTLD möglich. Anzunehmen ist, dass wie durch *Montone et*

a). gezeigt, keine Diskrepanzen zwischen der Expression von BZLF1 und dessen Genprodukt ZEBRA bestehen, wenngleich der immunhistochemische Nachweis der Expression des Proteins ZEBRA in dieser Arbeit nur für zwei systemische und drei cerebrale PTLD erbracht wurde [107]. Da für das Durchlaufen der lytischen Replikation eine Expression von BZLF1 und BRLF1 essentiell ist [57], muss für das cerebrale und systemische PTLD ohne BZLF1 Expression von einem abortiven Verlauf ausgegangen werden. Dass diese PTLD trotzdem BLLF1 exprimieren, könnte durch die vorhandene Expression von BRLF1 erklärt werden, welche für eine isolierte gp350- Expression ausreichend ist [57]. Weshalb es zu einer Reaktivierung der Replikation kommt und welche Funktion oder welchen Einfluss die damit verbundene Expression lytischer Proteine hat, ist bislang ungeklärt. Die Aktivierung des lytischen Zyklus, an dessen Anfang die Aktivierung des Promotors von BZLF1 (*Rp*) steht, kann durch TPA, Calcium Ionophore und Chemotherapie erfolgen, aber auch durch die Stimulation des B-Zell-Rezeptors (*BCR*) hervorgerufen werden [110]. Desweiteren kann oxidativer Stress zu einer deutlichen Steigerung der BZLF1 Expression führen [111]. Dies wäre ein möglicher Initiierungsmechanismus für die hier untersuchten systemischen und cerebralen PTLD, die häufig Nekrosen im Tumormaterial zeigten. Eine andauernde Stimulation des BCR durch das Transplantat ist eine andere Möglichkeit. Andere Gruppen konnten zeigen, dass Zellen des primär cerebralen DLBCL Immunkompetenter in der Mehrzahl der Fälle den hypoxia-inducible factor alpha und VEGF exprimieren, welches als Antwort auf oxidativen Stress zu interpretieren ist [112]. Hinzu kommt, dass bei einmal induziertem lytischen Zyklus das Durchlaufen der lytischen Phase an sich oxidativen Stress hervorrufen kann. Dies wurde an lytischen LCL beobachtet und könnte für einen sich selbst verstärkenden Zyklus von Lyse und oxidativem Stress sprechen [113].

Durch die hier erstmals erfolgte vergleichend quantitative Bestimmung der Expression von BZLF1, BRLF1 und BLLF1, konnte BRLF1 als das am stärksten, BZLF1 als das demgegenüber am schwächsten exprimierte Protein identifiziert werden. Studien fehlen, um einzuschätzen, wie das „natürliche“ Verhältnis der Proteinexpression im DLBCL-PTLD während der replikativen Phase ist. Da exzessiv gesteigerte Viruslasten bei EBV-assoziierten PTLD der Erwachsenen im Gegensatz zu den häufig auf eine Primärinfektion zurückzuführenden PTLD bei Kindern jedoch selten sind, ist eine ausgedehnte replikative Reaktivierung letztlich nicht anzunehmen [114]. Gerade auf diesem Hintergrund könnte die bis zu 40-fach starke Expression des BRLF1 auf eine besondere Bedeutung hindeuten, insbesondere da BRLF1 ausnahmslos in allen PTLD, auch denen mit fehlender BZLF1-Expression, nachgewiesen wurde. BRLF1 interagiert mit dem Tumorsuppressorprotein Retinoblastom (*Rb*), welches den Eintritt in die G₁/S-Phase kontrolliert, und führt durch dessen Inhibition zu einer Zellzyklusprogression [115]. BRLF1 kann zudem den Promotor von c-myc aktivieren [116]. Proapoptotische Wirkungen können auch über die

Steigerung der Expression des early Antigens BHRF1 erfolgen, welches als virales Homolog des zellulären BCL-2 und über die Inhibition von *Bim* und *Pten* antiapoptotisch wirkt [117, 118].

Die Untersuchungen an lymphoblastoiden Ziellinien in immundefizienten (SCID) Mäusen, konnte dem erneuten Eintritt in die lytisch replikative Phase weitere wichtige Funktion zuschreiben. *Hong et al.* untersuchten LCL mit knock-out von BZLF1 bzw. BRLF1 und fanden eine deutliche Verminderung der Expression von vascular endothelial growth factor (*VEGF*) [119]. In weiterführenden Experimenten wurden in SCID-Mäuse transplantierte DLBCL mit Antikörpern gegen den auto- und parakrinen VEGF-Rezeptor behandelt, was zu einer Abnahme des Tumorumens führte [120]. Die Expression der immediate early Antigene könnte damit zur Neoangiogenese beitragen und so das Wachstum der EBV-assoziierten PTLD begünstigen. VEGF führt ferner zu einer Expression des B-Zell-Wachstumsfaktors Interleukin 6 (*IL-6*) [121, 122]. Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass bei Patienten mit PTLD die IL-6 Serumlevel mit der Tumormasse korrelieren [123]. BZLF1 und BRLF1 selbst induzieren ebenfalls die IL-6 Produktion bzw. verstärken die durch LMP1-induzierte IL-6 Produktion [124]. Die Expression dieser Antigene kann somit auch ohne Eintritt in den replikativen Zyklus, die Proliferation fördern.

Allein basierend auf der Proteinexpression latenter und lytischer Antigene der EBV-assoziierten PTLD, konnten keine Unterschiede zwischen primär cerebralen und systemischen PTLD gefunden werden, weder im vorherrschenden Latenztyp, noch im mittleren Expressionsniveau der einzelnen EBV-Gene. Auch wenn die EBV-Assoziation der primär cerebralen PTLD insgesamt deutlich höher ist, so ist das Set der exprimierten Antigene weitgehend gleich. Unabhängig vom immunologischen Druck in den verschiedenen Kompartimenten scheint für den Prozess der EBV-induzierten Lymphoproliferation vom DLBCL-Typ die Expression aller dieser Antigene notwendig zu sein wobei die hohe Variation des Expressionsniveaus - bis hin zum Expressionsausfall einzelner Antigene - eine gewisse Redundanz vermuten lässt.

4.2 MicroRNA-Expression

Mit dieser Arbeit wurde die bisher umfassendste Untersuchung der microRNA Expression primär cerebraler und systemischer EBV-assoziiertes und nicht EBV-assoziiertes PTLD durchgeführt. In 9 cerebralen und 16 systemischen PTLD wurde die Expression von insgesamt 569 verschiedenen humanen und menschlich viralen microRNAs, davon 39 EBV-spezifischen microRNAs, festgestellt und die Expression dieser microRNAs in den verschiedenen Entitäten miteinander verglichen.

Anhand des unhierarchischen Clusterings der 569 in den untersuchten Proben exprimierten microRNAs ergaben sich drei Gruppen: die nicht EBV-assoziierten PTLD (Gruppe I), die Gruppe EBV-assoziiierter systemischer und primär cerebraler PTLD (weiterer unterteilt in die ebenfalls „gemischten“ Untergruppen IIa und IIb) und die Gruppe der EBV-assoziierten primär cerebralen PTLD (Gruppe III), die vier EBV-assoziierte primär cerebrale PTLD aber keine systemisches PTLD enthält. Das Clustering legt dabei eine stärkere Ähnlichkeit von Mitgliedern der Gruppe I zu denen der Gruppe IIa/IIb als zu Mitgliedern der Gruppe III nahe. Dies bedeutet zum einen, dass sich die Gruppenbildung stark an der EBV-Assoziation orientiert (deutlich auch durch ein fast identisches Clustering, welches sich bei isolierter Betrachtung der EBV-spezifischen microRNAs ergibt, s.u.) aber auch, dass die Expression humaner microRNAs in der Gruppe III der primär cerebralen EBV-assoziierten PTLD so stark von denen systemischer PTLDs abweicht, dass dies stärker ins Gewicht fällt als eine vorhandene oder fehlende EBV-Assoziation der PTLD.

4.2.1 Expression „typischer“ DLBCL-assoziiierter microRNAs

Die detaillierte Auswertung der Expression der verschiedenen microRNAs zeigte, dass die DLBCL-assoziierten microRNAs hsa-miR-155, hsa-miR-17-92 und hsa-miR-21 auch in DLBCL-PTLD sowie in den beiden Fällen eines plasmoblastischen und polymorphen PTLD gefunden werden können [74, 77, 78, 125]. In gewissem Maße überlappen sich damit die Prozesse bei klassischen DLBCL mit denen immunsuppressions-assoziiierter DLBCL. Allerdings wurden spezifische Unterschiede in den Gruppen der EBV-assoziierten und nicht EBV-assoziierten, systemischen, wie cerebralen DLBCL-PTLD festgestellt: Die microRNA hsa-miR-155, welche vorwiegend in den systemischen EBV-assoziierten PTLD, nicht aber in den primär cerebralen (EBV-assoziierten) PTLD der Gruppe III gefunden wurde [72], entsteht aus einem Teil des Transkripts des B-Zell Integration Cluster Gens (*BIC*) und hat onkogenes Potential [126]. Sie führt im transgenen Mausmodell zu pre-B-Zellproliferationen und high-grade B-Zell-Neoplasien in Mäusen, die hsa-miR-155 als Transgen tragen [127]. Dass hsa-miR-155 essentiell für das Wachstum von EBV-infizierten LCL und DLBCL-Zelllinien ist, zeigt sich durch den fehlenden Übergang von der G1- zu S-Phase bei fehlender hsa-miR-155 Expression [128]. Dabei beeinflusst hsa-miR-155 im DLBCL u.a. die das Zellwachstum hemmenden Proteine Bone morphogenic protein (*BMP*) und TGF- β 1 über SMAD5, welches Target der hsa-miR-155 ist [89]. Dass cerebrale PTLD der Gruppe III hsa-miR-155 sehr schwach insbesondere im Vergleich zu den systemischen DLBCL PTLD exprimieren steht im Kontrast zu Untersuchungsergebnissen primär cerebraler DLBCL, die eine signifikant gesteigerte Expression von hsa-miR-155 gegenüber nodalen DLBCL zeigen [78, 129]. Bezüglich einer vorliegenden EBV-Assoziation ist

bekannt, dass diese zu einer generell verminderten microRNA Expression führt, insbesondere aber zu einer verminderten Expression von hsa-miR-155 [77, 130].

Ähnlich der Expression des miR-17-92 Clusters in B-Zell Neoplasien [131], zeigen auch die in dieser Arbeit untersuchten PTLD die Expression des microRNA Clusters miR-17-92. Es zeigt sich allerdings, analog zur microRNA hsa-miR-155, eine vorwiegende Expression dieses Clusters durch PTLD der Gruppen I und II, cerebrale EBV-assoziierte PTLD (Gruppe III) exprimieren dieses Cluster allenfalls schwach. Dies differiert von der von Robertus *et. al* beschriebenen gesteigerten Expression des miR-17-92 Clusters primär cerebraler DLBCL vs. nDLBCL bei Immunkompetenten [78]. Zudem zeigen primär cerebrale EBV-assoziierte DLBCL HIV-Infizierter eine, im Vergleich zu systemischen DLBCL, stärkere Expression des miR-17-92 Clusters [132]. Das miR-17-92 Cluster umfasst die sechs microRNAs miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a und miR-92a und hat onkogenes Potential. Es wird zudem mit der Entwicklung maligner Lymphoproliferationen in Verbindung gebracht, da die microRNAs dieses Clusters in die Zellzyklus-Kontrolle eingreifen. Dies geschieht z.B. über den cyclinabhängigen Kinase Inhibitor CDKN1A, der u.a. für die Transition der G₁- zur S-Phase negativ reguliert. Zudem können microRNAs dieses Clusters das proapoptotische Bim und den Tumorsuppressor „Phosphatase and Tensin Homolog“ (*Pten*) regulieren. Durch die Repression von *Pten* wird beispielsweise der PI3K (phosphatidylinositol-3-Kinase)-Akt-mTOR (mammalian target of rapamycin)-Pathway aktiviert [133].

Hsa-miR-21 ist eine microRNA, die eine Überexpression nicht nur in DLBCL sondern auch in diversen Tumoren und Karzinomen zeigt. Die nicht EBV-assoziierten PTLD und PTLD der Gruppe II dieser Arbeit exprimierten hsa-miR-21 vergleichsweise stark. Cerebrale PTLD der Gruppe III zeigten eine deutlich schwache Expression dieser microRNA, deren onkogenes Potential in einem *in vivo* Modell nachgewiesen wurde. So entwickelten hsa-miR-21 transgene Mäuse binnen 3 Monaten eine Lymphadenopathie und klonale Vorläuferzellen einer B-Zell lymphoblastischen Leukämie. Wurden diese Zellen in NOD-SCID Mäuse implantiert, entwickelten diese in wenigen Wochen ein B-lymphoblastisches Lymphom. Es konnte weiter gezeigt werden, dass hsa-miR-21 nach der Initiierung des Lymphoms auch für dessen Fortbestehen notwendig ist und daher bei Abschalten der hsa-miR-21 Expression eine apoptotische Tumorregression beobachtet werden konnte [134]. Welche Proteine konkret Target der hsa-miR-21 im DLBCL oder seinen Zelllinien ist, konnte bisher nicht nachgewiesen werden, in Leukämiezelllinien jedoch führt die hsa-miR-21 Überexpression zur Inhibition des Tumorsuppressors *Pten* [135]. Da das Genom der hsa-miR-21 selbst in Tumoren, die eine stark erhöhte Expression zeigen, nicht amplifiziert ist, wird eine Regulation auf transkriptioneller oder post-transkriptioneller Ebene angenommen. STAT3 und AP-1 werden dabei als

Transkriptionsfaktoren für eine hsa-miR-21 Expression angesehen [136, 137]. Interessant in diesem Zusammenhang ist die konstitutive Expression von EBV-immediate-early-Antigenen in der Mehrzahl der untersuchten EBV-assoziierten PTLD, denn BZLF1 ist partielles Homolog zu c-Fos und bindet damit spezifisch an AP-1 Bindungsstellen [138]. Die auf diesem Wege mögliche Aktivierung von hsa-miR-21 könnte in Anbetracht dessen onkogenen Potentials der Expression von EBV-immediate-early-Antigenen eine besondere Bedeutung für das Wachstum und Fortbestehen des PTLDs geben.

Diese Gruppe cerebraler PTLD präsentiert sich also in Hinsicht auf die Expression typisch onkogener microRNAs vollkommen different von den hier untersuchten systemischen und cerebralen PTLD der Gruppe II und zudem different zu den Beobachtungen an primär cerebralen DLBCL Immunkompetenter und HIV-assoziiierter PCNSL und könnte dadurch, auf eine eigene Pathogenese hinweisen. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Ergebnisse der viralen microRNA Expression, die ebenfalls Besonderheiten dieser Gruppe herausstellen konnte.

4.2.2. Expression EBV-spezifischer microRNAs

Derzeit ist vergleichsweise wenig über die Funktion und Interaktion viraler microRNAs bekannt, aber von besonderer Bedeutung könnte die Expression des BHRF1-microRNA Clusters sein. Dieses Expressionscluster umfasst die drei microRNAs ebv-miR-BHRF1-1, ebv-miR-BHRF1-2 und ebv-miR-BHRF1-3. Das Cluster wird in Abhängigkeit des Latenzstadiums der EBV-infizierten Zellen exprimiert. Die microRNAs dieses Clusters befinden sich in 3' bzw. 5' untranslatierten Region der mRNA des BHRF1 Genes, welches für das virale BCL-2 Homolog kodiert [81]. Über die Promotoren, die während des Latenzstadiums III die Expression aller EBNA-Gene initiieren, erfolgt auch die Expression des BHRF1-microRNA Clusters [79]. Es konnte gezeigt werden, dass die Transformation der EBV-infizierten B-Zelle durch das BHRF1-miR-Cluster beeinflusst wird und dass bei dessen knock out die S-Phase schlechter passiert und die Transformation der Zelle um mehr als das 20-fache reduziert wird [83]. Denkbar ist, dass diese *in vitro* nachgewiesenen Eigenschaften des BHRF1-Clusters entsprechend zur Manifestation des PTLD beiträgt [139]. Dafür spricht auch die zumindest teilweise Expression dieses Clusters in nahezu allen EBV-assoziierten PTLD, mit Ausnahme von PTLD24. Die Vermutung, dass microRNAs dieses Clusters von besonderer Notwendigkeit sein könnten, wird weiter dadurch erhärtet, dass die nicht EBV-assoziierten PTLD scheinbar ein Homolog zu ebv-miR-BHRF1-1 exprimieren. Das Durchlaufen der lytisch replikativen Phase kann die durch dieses Cluster geförderte Transformation EBV-assoziiierter PTLD weiter verstärken, denn hierdurch wird einerseits die Transkription des BHRF1-Genes zum viralen Homolog des BCL-2 verstärkt [140] und auch die BHRF1-miR-Cluster Expression gesteigert

[82]. Dass die Expression des BHRF1-miR-Clusters eine besondere Bedeutung speziell für die Entwicklung des DLBCL unter immunsuppressiven Bedingungen haben könnte, zeigt sich einerseits durch eine ähnliche Expression in DLBCL bei HIV-Infizierten [95] und andererseits durch den fehlenden Nachweis des Clusters in EBV-positiven DLBCL der Immunkompetenten [77].

Zwei weitere microRNA-Cluster werden in der Gruppe separat clusternder primär cerebraler PTLD vermindert exprimiert. Diese Cluster enthalten zum einen die microRNAs ebv-miR-BART11-3p, ebv-miR-BART18-5p, ebv-miR-BART14*, ebv-miR-BART11-5p, ebv-miR-BART6-5p und zum anderen die microRNAs ebv-miR-BART10*, ebv-miR-BART2-3p, ebv-miR-BART7*, ebv-miR-BART18-3p und ebv-miR-BART5, ebv-miR-BART9*. Diese microRNAs stammen aus dem EBV BART-miRNA Clustern 1 und 2. Eine Deletion in diesem Bereich, wie sie bei einer natürlichen Variante von EBV, dem Subtyp EBV95.8, gefunden wird [141], erscheint als Erklärung der fehlenden Expression dieser beiden Cluster aber unwahrscheinlich, da diese auch zu einem Expressionsausfall der microRNAs ebv-miR-BART9 und ebv-miR-BART12 führen müssten, was in den untersuchte PTLD nicht der Fall war.

Über ebv-miR-BART6-5p ist bekannt, dass ihre Expression zu einer Inhibition von *Dicer* führen kann und ihre Antagonisierung eine gesteigerte Expression der mRNA von LMP1, EBNA2, BZLF1 und BRLF1 hervorrufen kann [93]. Nimmt man, wie von *lizazsa et al.* vorgeschlagen an, dass ebv-miR-BART6-5p das virale Äquivalent der humanen hsa-let-7 ist, so wirkt auch sie als Tumorsuppressor microRNA, denn auch hsa-let-7 reguliert *Dicer* [142]. In vielen Tumoren wurde eine reduzierte Expression von hsa-let-7 gefunden. Die dadurch gesteigerte Expression von *Dicer* führt zu zellulärer Transformation und unterstützt die Tumorprogression [143]. Auch ist die Expression von hsa-let-7 mit einem schlechteren Überleben assoziiert [144]. EBV-miR-BART5 inhibiert die Funktion des proapoptotischen Proteins PUMA [84].

Durch den Vergleich der microRNA Expression konnten in diese Arbeit Unterschiede zwischen (1) systemischen und primär cerebralen PTLD, (2) EBV-assoziierten und nicht EBV-assoziierten PTLD sowie (3) innerhalb der Gruppe der primär cerebralen PTLD nachgewiesen werden. Der Vergleich der microRNA Expression aller systemischer mit allen primär cerebralen PTLD zeigte ferner, dass spezifisch die microRNAs hsa-miR-124 und hsa-miR-219-5p durch primär cerebrale PTLD überexprimiert werden während hsa-miR-10a/b und hsa-miR-199b-5p in primär cerebralen PTLD nur sehr schwach exprimiert sind.

microRNA	Gruppe		
	I	IIa/b	III
hsa-miR-155 fördert Übergang G ₁ /S-Phase in EBV ⁺ LCL hemmt BMP und TGF- β über Hemmung von SMAD5	+	+	-*
miR-17-92 fördert Übergang G ₁ /S-Phase über Hemmung von CDKN1A Hemmung Tumorsuppressor Pten Hemmung des proapoptotischen Bim	+	+	-*
hsa-miR-21 Hemmung des Tumorsuppressors Pten	+	+	-
hsa-let-7 Hemmung von <i>Dicer</i> und damit tumorsuppressiv	+	+	-
ebv-miR-BHRF1 Cluster fördert Transformation der EBV-infizierten Zelle	-	+	+
ebv-miR-BART6-5p virales Äquivalent humaner hsa-miR-let-7 Hemmung von <i>Dicer</i> und damit tumorsuppressiv	-	+	-
ebv-miR-BART5 Inhibition des proapoptotischen Puma	-	+	-

Tabelle 11. Zusammenfassende Darstellung der Expression von Tumor- und DLBCL-typischen microRNAs sowie viraler microRNAs und deren Funktion. *= konträr zu pCNS Lymphomen Immunkompetenter, -=keine bis schwache Expression, +=starke Expression

Das vollständige Fehlen der Expression von hsa-miR-124 in fast allen systemischen PTLD und die dem gegenüber starke Expression in cerebralen PTLD, ist am ehesten auf eine „Kontamination“ einiger Proben mit Gehirngewebe bei bekannter gehirnspezifischer Expression dieser microRNA [145] zurückzuführen und wurde ähnlich auch in anderen Arbeiten gefunden [129]. Ein ähnliches Expressionsmuster wurde auch für die microRNA hsa-miR-219 gefunden. Die Funktion dieser microRNA ist weitgehend unbekannt. Im Zebrafisch wird ein Homolog aber als ZNS-spezifisch exprimiert beschrieben [146]. Dass diese microRNA bisher nicht beschrieben wurde erklärt sich durch die geringere Zahl insgesamt untersuchte microRNAs in analogen Arbeiten [78, 129].

Ein weiteres Ergebnis des direkten Vergleichs der microRNA-Expression aller cerebraler mit allen systemischen PTLD war der Aspekt einer verstärkten Expression des hsa-miR-10 Clusters durch die systemischen PTLD. Eine gesteigerte Expression dieser, im normalen Hirngewebe *nicht* exprimierten microRNA [147], wurde in Pankreaskarzinomen und Glioblastomen beschrieben [148-150] und ist mit der Metastasierung von Mamma-, und Nasopharyngealkarzinomen [148, 151] assoziiert. Die Expression dieser microRNAs in allen

systemischen PTLD aber nur 2/9 primär cerebralen PTLD könnte auf eine spezielle Rolle in der Pathogenese der systemischen PTLD hinweisen. Hsa-miR-10 ist ein Regulator der Biosynthese des Ribosoms und damit der Proteinbiosynthese. Anders, als die zuvor beschriebenen microRNAs, führt die Expression von hsa-miR-10 und die Bindung an ihre Targets, welche verschiedene ribosomale Proteine sind, zu deren gesteigerter Translation und damit zu einer gesteigerten globalen Proteinsynthese [152]. Eine global gesteigerte Translation ribosomaler Proteine wird häufig in Karzinomen beobachtet [153] und die Inhibition der Translation ribosomaler Proteine ist Ziel verschiedener Tumorsuppressoren, wie p53. Ihre gesteigerte Expression hingegen ist Ziel von Protoonkogenen, wie c-myc [154, 155]. So wird in Zelllinien durch die Transfektion mit hsa-miR-10a u.a. die Translation ribosomaler Proteine und die Transformation RAS mutierter Zellen gesteigert [152].

Neben hsa-miR-10 wurden auch die microRNAs hsa-miR-199 und -214 in systemischen PTLD signifikant stärker exprimiert als in primär cerebralen PTLD, wenngleich eine schwache Expression von hsa-miR-199 auch in primär cerebralen PTLD nachgewiesen werden konnte. Die genaue Funktion dieser auch in T-Zell-Lymphomen [156] und DLBCL überexprimierten microRNA (hsa-miR-199) ist unbekannt. Folgende Zusammenhänge aber wurden beschrieben: Über den „Hypoxie-induzierbaren Faktor 1 alpha“ (HIF-1 α) wird unter hypoxischen Bedingungen u.a. über VEGF die Bildung neuer Blutgefäße induziert [157] sowie eine Aktivierung von Onkogenen und eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen erreicht [158, 159]. *Rane et al.* konnten kürzlich zeigen, dass HIF-1 α Target der microRNAs hsa-miR-199a und -119b-5p ist [160, 161]. Eine reduzierte Expression von hsa-miR-199 in cerebralen PTLD könnte damit eine gesteigerte HIF-1 α Expression zur Folge haben und Hypoxie-induzierte Resistenzmechanismen könnten dadurch verstärkt sein. Angesichts der limitierten therapeutischen Optionen in der Behandlung cerebraler PTLD kann auf der Grundlage dieser Daten der Einsatz von Histon-Deacetylase-Inhibitoren [162], die die HIF-1 α -Expression reduzieren [163], eine neue therapeutische Option eröffnen. Neben der Beeinflussung der HIF-1 α Expression, zeigten andere Arbeiten, dass hsa-miR-199a auch die Proteinkinase IKK β reguliert, welche die Expression von NF- κ B fördert [164]. Der „Nuclear Factor- κ B“ (NF- κ B), ist ein Transkriptionsfaktor, der nach seiner Aktivierung die Chemokinproduktion induziert, Wachstum vermittelt und antiapoptotisch wirkt [165]. In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine konstitutive Aktivierung des NF- κ B-Pathways zur Entwicklung des ABC-Typs des DLBCL führt [166]. Zudem wird angenommen, dass die Expression von NF- κ B zu einer verstärkten Chemotherapieresistenz beiträgt [167]. Die Inhibition von NF- κ B in Chemotherapie-resistenten Tumoren kann andererseits Chemotherapieresistenz durchbrechen [168].

Auch hsa-miR-214, -130b, 143 und -145 zählen zu jenen microRNAs, die in systemischen PTLD

signifikant stärker exprimiert werden als in primär cerebralen PTLD. Die tumorsuppressive microRNA hsa-miR-145 interagiert mit dem p53-Pathway und führt zu einer reduzierten Expression von c-myc [169]. Ebenso greift auch hsa-miR-143 als Tumorsuppressor in den Pathway der c-myc Aktivierung ein. Als Target konnte die ERK5-MAPK identifiziert werden, welche ihrerseits c-myc aktiviert. Eine reduzierte hsa-miR-143 Expression, wie sie auch in DLBCL, B-Zell-Lymphomzelllinien [170] und in Kolonkarzinomen [171] gefunden wurde, kann die Repression von ERK5-MAPK verhindern und so c-myc aktivieren [170]. In primär cerebralen PTLD scheint damit die c-myc vermittelte Proliferation eine wichtigere Rolle einzunehmen als in systemischen PTLD.

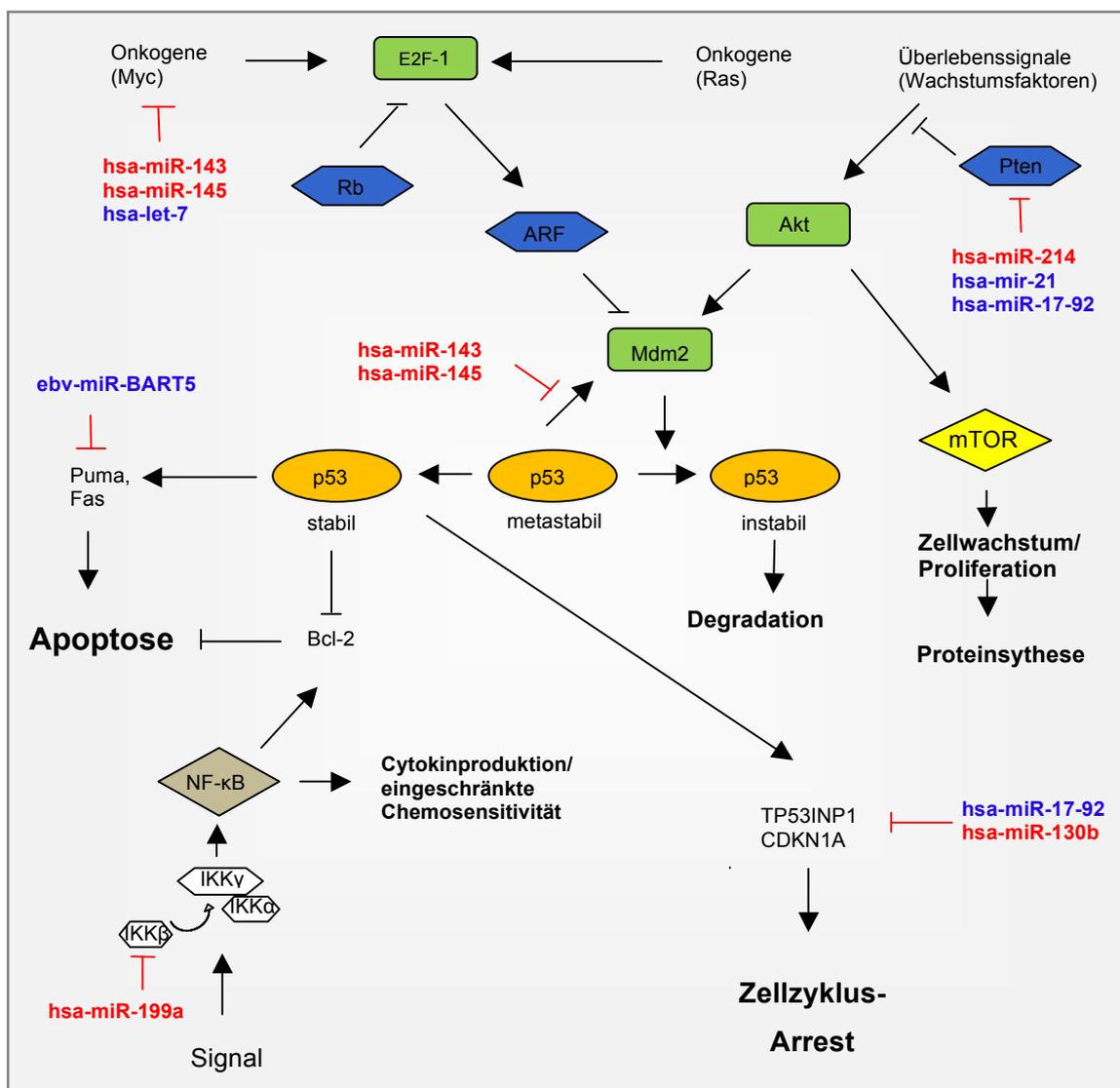


Abbildung 20. Zusammenfassende Darstellung der beeinflussten Pathways durch microRNAs. Rot dargestellt signifikant überexprimierte microRNAs von sPTLD (t-Test). Blau dargestellt relativ unterexprimierte microRNAs von pCNS PTLD der Gruppe III entsprechend des unhierarchischen Clusterings. Abbildung in Anlehnung an [1-3].

Die in den systemischen PTLD überexprimierte microRNA hsa-miR-214 inhibiert den Pathway des Tumorsuppressors Pten und wirkt damit antiapoptotisch und proliferativ [172, 173]. Auch die stärkere Expression von hsa-miR-130b in systemischen PTLD dürfte das apoptotische Potential negativ beeinflussen. Hsa-miR-130b ist ein Repressor des durch zellulären Stress induzierbaren proapoptotischen Tumorsuppressorproteins „tumor protein 53-induced nuclear protein 1“ (*TP53INP1*), welches p53 phosphoryliert und so stabilisiert. Ihr knock out führt im Mausmodell zur Entstehung von Lymphomen [174, 175].

microRNA	EBV ^{+/-} sPTLD	EBV ^{+/-} pCNS PTLD
hsa-miR-124 gehirnspezifische Expression	-	+
hsa-miR-219-5p gehirnspezifische Expression	-	+
hsa-miR-10a/b Steigerung Proteinbiosynthese durch gesteigerte Translation ribosomaler Proteine Hemmung der HOXA1-Expression	+	-
hsa-miR-199 Hemmung von HIF-1 α und damit Verminderte Hypoxie-induzierte Resistenz Hemmung von IKK β und damit Hemmung von NF- κ B	+	Schwach + Resistenz \uparrow
hsa-miR-145 Hemmung von c-myc	+	-
hsa-miR-143 Hemmung von c-myc	+	-
hsa-miR-214 Hemmung von Pten (Tumorsuppressor) und damit antiapoptotisch und proliferativ	+	-
hsa-mir-130b Hemmung von TP53INP1 (Tumorsuppressor)	+	-

Tabelle 12. Zusammenfassende Darstellung der Funktionen der signifikant different zwischen pCNS PTLD und sPTLD exprimierten microRNAs. -=keine bis schwache Expression, +=starke Expression

Insgesamt legen die Daten der microRNA-Expressionsanalyse damit nahe, dass bei primär cerebralen PTLD pathogenetisch eine c-myc induzierte Hyperproliferation mit erhöhter Hypoxie-induzierter und NF- κ B-vermittelter Therapieresistenz im Vordergrund stehen könnte. Die starke Expression von EBNA3A könnte, durch die Inhibition des proapoptotisch wirkendem Bim, hier synergistisch wirken; ebenso die EBNA3-vermittelte p16INK4A-Suppression und die durch BRLF1-vermittelte Rb-Suppression und erklären, warum die EBV-Assoziation bei einem Teil der primär cerebralen PTLD zwingender Bestandteil der Pathogenese ist.

In einem anderen Teil primär cerebraler PTLD finden sich durch die starke Expression der Pten inhibierenden microRNAs hsa-mir-17-92 und hsa-mir-21 zusätzlich Zeichen einer EBV-unabhängigen Aktivierung des AKT-mTOR-Pathways. Diese Gruppe primär cerebraler PTLD steht damit den systemischen PTLD nahe, bei welchen die Pten-Inhibition durch eine starke Expression der microRNA hsa-mir-214 weiter verstärkt zu sein scheint. Die durch hsa-17-92 über cDKN1A induzierte Hyperproliferation und das durch eine starke hsa-mir-10a/b-Expression erhöhte Potenzial zur Proteinbiosynthese sind weitere Kennzeichen, dass (EBV-unabhängig) Proliferation stimuliert ist. Gleichzeitig scheint in diesen PTLD p53 durch eine starke Expression der microRNA hsa-mir-130b durch eine Inhibition von TP53INP1 destabilisiert zu sein.

Ein Teil der EBV-assoziierten primär cerebralen PTLD verhält sich somit wie systemische PTLDs, ein anderer Teil nutzt alternative Pathways, die eine deutlich stärkere EBV-Abhängigkeit vermuten lassen.

Ob die Unterteilung EBV-assoziiertes primär cerebraler PTLD in diese beiden microRNA-Expressionscluster auch prognostische Relevanz besitzt, muss in einem größeren Patientenkollektiv beantwortet werden. Es ist allerdings auffällig, dass in der Gruppe der mit den systemischen PTLD clusternden primär cerebralen PTLD nur einer von drei Patienten zum Zeitpunkt der Analyse bereits verstorben war, hingegen aber 4 von 5 in der Gruppe der isoliert clusternden primär cerebralen PTLD.

5. Zusammenfassung

Das primär cerebrale Posttransplantationslymphom ist eine seltene, auf das zentrale Nervensystem begrenzte lymphoproliferative Erkrankung, die nach einer Organtransplantation auftreten kann und mit einer Überlebensrate von nur 32% nach zwei Jahren einhergeht.

Überwiegend entspricht das primär cerebrale PTLD histopathologisch dem DLBCL. Zu ca. 90% ist es mit dem Epstein-Barr-Virus assoziiert wohingegen systemische DLBCL-Typ PTLDs nur in etwa 40%-50% der Fälle eine EBV-Assoziation zeigen. Die Expression latenter und lytischer Proteine beeinflussen die Pathogenese der Erkrankung. Allerdings unterscheidet sich das primär cerebrale PTLD in seiner EBV-Proteinexpression nicht von den EBV-assozierten systemischen PTLDs.

In 7 von 8 EBV-assozierten primär cerebralen PTLD konnte ein Latenztyp III nachgewiesen werden. Alle cerebralen PTLD exprimierten zumindest eines der untersuchten lytischen Proteine. 7 der 8 EBV-assozierten cerebralen PTLD exprimierten BZLF1. In 6/8 Fällen kann formal der komplette lytische Zyklus durchlaufen werden. Die Verhältnisse gleichen denen bei den 8 untersuchten Fällen systemischer EBV-assoziierter PTLD. Auch fanden sich keine Unterschiede im Expressionsniveau der einzelnen latenten und lytischen Proteine zwischen diesen beiden Gruppen. EBN3A wird in beiden Gruppen am stärksten exprimiert. BRLF1 ist in beiden Gruppen das am stärksten exprimierte lytische Antigen.

Im microRNA-Expressionsprofiling konnten dann aber insgesamt drei Gruppen definiert werden: (1) die Gruppe der nicht EBV-assozierten PTLD, (2) eine Gruppe EBV-assoziierter systemischer und primär cerebraler PTLD und (3) eine Gruppe, die ausschließlich EBV-assozierte primär cerebrale PTLD enthielt. Entscheidende Cluster die zur Bildung dieser Gruppen führten, umfassten neben EBV-assozierten viralen microRNAs, DLBCL-typische microRNAs und microRNAs, die auch in anderen Tumorentitäten als über- oder unterexprimiert beschrieben wurden. Das zweite, separate Cluster primär cerebraler PTLD ist dabei gekennzeichnet durch eine schwächere Expression der DLBCL-typischen microRNAs hsa-miR-155, hsa-miR-21 und hsa-miR-17-92 sowie der viralen microRNAs ebv-miR-BHRF1-1 bis -3 und Teilen des BART-1 und-2 Clusters. Ebenfalls vermindert exprimiert sind alle Mitglieder der hsa-let-7 Familie, denen tumorsuppressive Eigenschaften zugeschrieben werden.

Die differierenden microRNA-Expressionsprofile deuten auf zwei verschiedene Muster dysregulierter Pathways in EBV-assozierten primär cerebralen PTLD hin. In der Gruppe der zu den systemischen EBV-assozierten PTLD differierenden Gruppe primär cerebraler PTLD könnte ein entscheidender Synergismus im Bereich c-myc-induzierter Proliferation EBNA3A vermittelter

Bim-Inhibition sowie BRLF-1-vermittelter Rb-Suppression bestehen, der eine EBV-Assoziation für die Pathogenese unabdingbar machen könnte. Die prognostische Relevanz der Nutzung unterschiedlicher Pathomechanismen in der Gruppe der EBV-assoziierten primäre cerebralen PTLD muss in einem größeren Patientenkollektiv beantwortet werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Gewies, A. *The p53 network – survival and cell death regulation*. 2006; Available from: http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/revfigs/revfig_8.htm.
2. Reuters, T. *Apoptosis and survival_antiapoptotic TNFS/NF-KB/BCL-2 pathway*. [cited 2012 01.10.2012]; Available from: <http://pathwaymaps.com/maps/720/>.
3. Delmonte, A., M. Ghielmini, and C. Sessa, *Beyond monoclonal antibodies: new therapeutic agents in non-Hodgkin's lymphomas*. *Oncologist*, 2009. 14(5): p. 511-25.
4. Steven H. Swerdlow, T.I.A.f.R.o.v.W.H.O., *Who Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues Fourth Edition* 2008. 441.
5. Vajdic, C.M. and M.T. van Leeuwen, *Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation*. *Int J Cancer*, 2009. 125(8): p. 1747-54.
6. Navarro, M.D., et al., *Cancer incidence and survival in kidney transplant patients*. *Transplant Proc*, 2008. 40(9): p. 2936-40.
7. Sampaio, M.S., et al., *Association of immunosuppressive maintenance regimens with posttransplant lymphoproliferative disorder in kidney transplant recipients*. *Transplantation*, 2012. 93(1): p. 73-81.
8. Kirk, A.D., et al., *Dissociation of depletion induction and posttransplant lymphoproliferative disease in kidney recipients treated with alemtuzumab*. *Am J Transplant*, 2007. 7(11): p. 2619-25.
9. Engels, E.A., et al., *Spectrum of cancer risk among US solid organ transplant recipients*. *JAMA*, 2011. 306(17): p. 1891-901.

10. Ho, M., et al., *The frequency of Epstein-Barr virus infection and associated lymphoproliferative syndrome after transplantation and its manifestations in children*. Transplantation, 1988. 45(4): p. 719-27.
11. Haque, T., et al., *Transmission of donor Epstein-Barr virus (EBV) in transplanted organs causes lymphoproliferative disease in EBV-seronegative recipients*. J Gen Virol, 1996. 77 (Pt 6): p. 1169-72.
12. Hussein, K., et al., *[Transplant-associated lymphoproliferation]*. Pathologie, 2011. 32(2): p. 152-8.
13. Stojanova, J., et al., *Post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD): Pharmacological, virological and other determinants*. Pharmacol Res, 2011. 63(1): p. 1-7.
14. Opelz, G. and B. Dohler, *Lymphomas after solid organ transplantation: a collaborative transplant study report*. Am J Transplant, 2004. 4(2): p. 222-30.
15. Jagadeesh, D., et al., *Post transplant lymphoproliferative disorders: risk, classification, and therapeutic recommendations*. Curr Treat Options Oncol. 13(1): p. 122-36.
16. Parker, A., et al., *Diagnosis of post-transplant lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients - BCSH and BTS Guidelines*. Br J Haematol, 2010. 149(5): p. 675-92.
17. Trappe, R., et al., *Sequential treatment with rituximab followed by CHOP chemotherapy in adult B-cell post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD): the prospective international multicentre phase 2 PTLD-1 trial*. Lancet Oncol, 2011.
18. Tascou, S., et al., *Identification and characterization of NIF3L1 BP1, a novel cytoplasmic interaction partner of the NIF3L1 protein*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. 309(2): p. 440-8.

19. Penn, I. and G. Porat, *Central nervous system lymphomas in organ allograft recipients*. *Transplantation*, 1995. 59(2): p. 240-4.
20. Caillard, S., et al., *Post-transplant lymphoproliferative disorders occurring after renal transplantation in adults: report of 230 cases from the French Registry*. *Am J Transplant*, 2006. 6(11): p. 2735-42.
21. Evens, A.M., et al., *Multicenter analysis of 80 solid organ transplantation recipients with post-transplantation lymphoproliferative disease: outcomes and prognostic factors in the modern era*. *J Clin Oncol*, 2010. 28(6): p. 1038-46.
22. Dharnidharka, V.R., et al., *Improved survival with recent Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder (PTLD) in children with kidney transplants*. *Am J Transplant*, 2011. 11(4): p. 751-8.
23. Reshef, R., et al., *Reduction of immunosuppression as initial therapy for posttransplantation lymphoproliferative disorder(bigstar)*. *Am J Transplant*, 2011. 11(2): p. 336-47.
24. Alizadeh, A.A., et al., *Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling*. *Nature*, 2000. 403(6769): p. 503-11.
25. Hans, C.P., et al., *Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray*. *Blood*, 2004. 103(1): p. 275-82.
26. Gutierrez-Garcia, G., et al., *Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy*. *Blood*, 2011. 117(18): p. 4836-43.
27. Capello, D., D. Rossi, and G. Gaidano, *Post-transplant lymphoproliferative disorders: molecular basis of disease histogenesis and pathogenesis*. *Hematol Oncol*, 2005. 23(2): p. 61-7.

28. Cesarman, E., et al., *BCL-6 gene mutations in posttransplantation lymphoproliferative disorders predict response to therapy and clinical outcome*. *Blood*, 1998. 92(7): p. 2294-302.
29. Swinnen, L.J., et al., *Prospective study of sequential reduction in immunosuppression, interferon alpha-2B, and chemotherapy for posttransplantation lymphoproliferative disorder*. *Transplantation*, 2008. 86(2): p. 215-22.
30. Oertel, S.H., et al., *Effect of anti-CD 20 antibody rituximab in patients with post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD)*. *Am J Transplant*, 2005. 5(12): p. 2901-6.
31. Choquet, S., et al., *CHOP-21 for the treatment of post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD) following solid organ transplantation*. *Haematologica*, 2007. 92(2): p. 273-4.
32. Phan, T.G., B.P. O'Neill, and P.J. Kurtin, *Posttransplant primary CNS lymphoma*. *Neuro Oncol*, 2000. 2(4): p. 229-38.
33. Snanoudj, R., et al., *Primary brain lymphomas after kidney transplantation: presentation and outcome*. *Transplantation*, 2003. 76(6): p. 930-7.
34. Khalfallah, S., et al., *Durable remission of a relapsing primary central nervous system lymphoma after autologous bone marrow transplantation*. *Bone Marrow Transplant*, 1996. 18(5): p. 1021-3.
35. Agapitos, E., et al., *Non-Hodgkin lymphoma of brain occurring after cardiac transplantation*. *J Exp Clin Cancer Res*, 1997. 16(4): p. 441-3.
36. Oyama, H., et al., *[A case of malignant lymphoma after renal transplantation]*. *No Shinkei Geka*, 1997. 25(7): p. 655-60.
37. Cavaliere, R., et al., *Primary central nervous system post-transplantation lymphoproliferative disorder: an International Primary Central Nervous System Lymphoma Collaborative Group Report*. *Cancer*, 2010. 116(4): p. 863-70.

38. Castellano-Sanchez, A.A., et al., *Primary central nervous system posttransplant lymphoproliferative disorders*. Am J Clin Pathol, 2004. 121(2): p. 246-53.
39. Jagadeesh, D., et al., *Post transplant lymphoproliferative disorders: risk, classification, and therapeutic recommendations*. Curr Treat Options Oncol, 2012. 13(1): p. 122-36.
40. Epstein, M.A., B.G. Achong, and Y.M. Barr, *Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma*. Lancet, 1964. 1(7335): p. 702-3.
41. Maeda, E., et al., *Spectrum of Epstein-Barr virus-related diseases: a pictorial review*. Jpn J Radiol, 2009. 27(1): p. 4-19.
42. Tanner, J., et al., *Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis*. Cell, 1987. 50(2): p. 203-13.
43. Catalina, M.D., et al., *Differential evolution and stability of epitope-specific CD8(+) T cell responses in EBV infection*. J Immunol, 2001. 167(8): p. 4450-7.
44. Levitskaya, J., et al., *Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1*. Nature, 1995. 375(6533): p. 685-8.
45. Henle, W., et al., *Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells*. Science, 1967. 157(792): p. 1064-5.
46. Mosialos, G., et al., *The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family*. Cell, 1995. 80(3): p. 389-99.
47. Kaye, K.M., et al., *Tumor necrosis factor receptor associated factor 2 is a mediator of NF-kappa B activation by latent infection membrane protein 1, the Epstein-Barr virus transforming protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(20): p. 11085-90.
48. Cheng, G., et al., *Involvement of CRAF1, a relative of TRAF, in CD40 signaling*. Science, 1995. 267(5203): p. 1494-8.

49. Uchida, J., et al., *Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses*. Science, 1999. 286(5438): p. 300-3.
50. Rowe, M., et al., *Upregulation of bcl-2 by the Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP1: a B-cell-specific response that is delayed relative to NF-kappa B activation and to induction of cell surface markers*. J Virol, 1994. 68(9): p. 5602-12.
51. Kaye, K.M., K.M. Izumi, and E. Kieff, *Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(19): p. 9150-4.
52. Wang, D., D. Liebowitz, and E. Kieff, *An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells*. Cell, 1985. 43(3 Pt 2): p. 831-40.
53. Miller, G., et al., *Differences between laboratory strains of Epstein-Barr virus based on immortalization, abortive infection and interference*. IARC Sci Publ, 1975(11 Pt 1): p. 395-408.
54. Abbot, S.D., et al., *Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces expression of the virus-encoded latent membrane protein*. J Virol, 1990. 64(5): p. 2126-34.
55. Cordier, M., et al., *Stable transfection of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 in lymphoma cells containing the EBV P3HR1 genome induces expression of B-cell activation molecules CD21 and CD23*. J Virol, 1990. 64(3): p. 1002-13.
56. Nitsche, F., A. Bell, and A. Rickinson, *Epstein-Barr virus leader protein enhances EBNA-2-mediated transactivation of latent membrane protein 1 expression: a role for the W1W2 repeat domain*. J Virol, 1997. 71(9): p. 6619-28.
57. Feederle, R., et al., *The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the co-operative functions of two transactivators*. EMBO J, 2000. 19(12): p. 3080-9.

58. Mahot, S., et al., *A novel function for the Epstein-Barr virus transcription factor EB1/Zta: induction of transcription of the hIL-10 gene*. J Gen Virol, 2003. 84(Pt 4): p. 965-74.
59. Cayrol, C. and E.K. Flemington, *Identification of cellular target genes of the Epstein-Barr virus transactivator Zta: activation of transforming growth factor beta igh3 (TGF-beta igh3) and TGF-beta 1*. J Virol, 1995. 69(7): p. 4206-12.
60. Zhang, Q., D. Gutsch, and S. Kenney, *Functional and physical interaction between p53 and BZLF1: implications for Epstein-Barr virus latency*. Mol Cell Biol, 1994. 14(3): p. 1929-38.
61. Rodriguez, A., et al., *Genetic dissection of cell growth arrest functions mediated by the Epstein-Barr virus lytic gene product, Zta*. J Virol, 1999. 73(11): p. 9029-38.
62. Mauser, A., et al., *The Epstein-Barr virus immediate-early protein BZLF1 induces both a G(2) and a mitotic block*. J Virol, 2002. 76(19): p. 10030-7.
63. Li, Y., et al., *The C-mer gene is induced by Epstein-Barr virus immediate-early protein BRLF1*. J Virol, 2004. 78(21): p. 11778-85.
64. Li, Y., et al., *Fatty acid synthase expression is induced by the Epstein-Barr virus immediate-early protein BRLF1 and is required for lytic viral gene expression*. J Virol, 2004. 78(8): p. 4197-206.
65. Esquela-Kerscher, A. and F.J. Slack, *Oncomirs - microRNAs with a role in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. 6(4): p. 259-69.
66. Griffiths-Jones, S., et al., *miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature*. Nucleic Acids Res, 2006. 34(Database issue): p. D140-4.
67. Griffiths-Jones. *miRBASE*. 2012 November 2011 [cited 2012 10.01.2012]; 18:[Available from: http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa].

68. He, L. and G.J. Hannon, *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. Nat Rev Genet, 2004. 5(7): p. 522-31.
69. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. 116(2): p. 281-97.
70. Vasudevan, S., *Posttranscriptional upregulation by microRNAs*. Wiley Interdiscip Rev RNA. 3(3): p. 311-30.
71. Chen, C.Z., et al., *MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation*. Science, 2004. 303(5654): p. 83-6.
72. Kluiver, J., et al., *Lack of BIC and microRNA miR-155 expression in primary cases of Burkitt lymphoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2006. 45(2): p. 147-53.
73. Kluiver, J., et al., *BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas*. J Pathol, 2005. 207(2): p. 243-9.
74. Lawrie, C.H., et al., *MicroRNA expression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of diffuse large B cell lymphoma*. Int J Cancer, 2007. 121(5): p. 1156-61.
75. Roehle, A., et al., *MicroRNA signatures characterize diffuse large B-cell lymphomas and follicular lymphomas*. Br J Haematol, 2008. 142(5): p. 732-44.
76. Malumbres, R., et al., *Differentiation stage-specific expression of microRNAs in B lymphocytes and diffuse large B-cell lymphomas*. Blood, 2009. 113(16): p. 3754-64.
77. Imig, J., et al., *microRNA profiling in Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoma*. Nucleic Acids Res, 2011. 39(5): p. 1880-93.
78. Robertus, J.L., et al., *Specific expression of miR-17-5p and miR-127 in testicular and central nervous system diffuse large B-cell lymphoma*. Mod Pathol, 2009. 22(4): p. 547-55.

79. Cai, X., et al., *Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed*. PLoS Pathog, 2006. 2(3): p. e23.
80. Griffiths-Jones, S., *miRBase: the microRNA sequence database*. Methods Mol Biol, 2006. 342: p. 129-38.
81. Pfeffer, S., et al., *Identification of virus-encoded microRNAs*. Science, 2004. 304(5671): p. 734-6.
82. Xing, L. and E. Kieff, *Epstein-Barr virus BHRF1 micro- and stable RNAs during latency III and after induction of replication*. J Virol, 2007. 81(18): p. 9967-75.
83. Feederle, R., et al., *A viral microRNA cluster strongly potentiates the transforming properties of a human herpesvirus*. PLoS Pathog, 2011. 7(2): p. e1001294.
84. Choy, E.Y., et al., *An Epstein-Barr virus-encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival*. J Exp Med, 2008. 205(11): p. 2551-60.
85. Page, R.B. and A.J. Stromberg, *Linear methods for analysis and quality control of relative expression ratios from quantitative real-time polymerase chain reaction experiments*. ScientificWorldJournal. 11: p. 1383-93.
86. Liu, A., et al., *MicroRNA expression profiling outperforms mRNA expression profiling in formalin-fixed paraffin-embedded tissues*. Int J Clin Exp Pathol, 2009. 2(6): p. 519-27.
87. Bolstad, B.M., et al., *A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias*. Bioinformatics, 2003. 19(2): p. 185-93.
88. Kelly, G.L., et al., *Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2) gene deletion is consistently linked with EBNA3A, -3B, and -3C expression in Burkitt's lymphoma cells and with increased resistance to apoptosis*. J Virol, 2005. 79(16): p. 10709-17.

89. Rai, D., et al., *Targeting of SMAD5 links microRNA-155 to the TGF-beta pathway and lymphomagenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(7): p. 3111-6.
90. Kim, H.H., et al., *HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression*. Genes Dev, 2009. 23(15): p. 1743-8.
91. Sempere, L.F., et al., *Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation*. Genome Biol, 2004. 5(3): p. R13.
92. Barth, S., et al., *Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5*. Nucleic Acids Res, 2008. 36(2): p. 666-75.
93. Iizasa, H., et al., *Editing of Epstein-Barr virus-encoded BART6 microRNAs controls their dicer targeting and consequently affects viral latency*. J Biol Chem, 2010. 285(43): p. 33358-70.
94. Feederle, R., et al., *The members of a viral miRNA cluster co-operate to transform B lymphocytes*. J Virol, 2011.
95. Xia, T., et al., *EBV microRNAs in primary lymphomas and targeting of CXCL-11 by ebv-mir-BHRF1-3*. Cancer Res, 2008. 68(5): p. 1436-42.
96. Hildebrandt, B., et al., *Treatment of locally recurrent rectal cancer with special focus on regional pelvic hyperthermia*. Onkologie, 2004. 27(5): p. 506-11.
97. Cohen, J.I., et al., *Current understanding of the role of Epstein-Barr virus in lymphomagenesis and therapeutic approaches to EBV-associated lymphomas*. Leuk Lymphoma, 2008. 49 Suppl 1: p. 27-34.
98. Oudejans, J.J., et al., *Detection of heterogeneous Epstein-Barr virus gene expression patterns within individual post-transplantation lymphoproliferative disorders*. Am J Pathol, 1995. 147(4): p. 923-33.

99. Tomkinson, B., E. Robertson, and E. Kieff, *Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation*. J Virol, 1993. 67(4): p. 2014-25.
100. Anderton, E., et al., *Two Epstein-Barr virus (EBV) oncoproteins cooperate to repress expression of the proapoptotic tumour-suppressor Bim: clues to the pathogenesis of Burkitt's lymphoma*. Oncogene, 2008. 27(4): p. 421-33.
101. Maruo, S., et al., *Epstein-Barr Virus nuclear protein EBNA3A is critical for maintaining lymphoblastoid cell line growth*. J Virol, 2003. 77(19): p. 10437-47.
102. Cooper, A., et al., *EBNA3A association with RBP-Jkappa down-regulates c-myc and Epstein-Barr virus-transformed lymphoblast growth*. J Virol, 2003. 77(2): p. 999-1010.
103. Robertson, E.S., J. Lin, and E. Kieff, *The amino-terminal domains of Epstein-Barr virus nuclear proteins 3A, 3B, and 3C interact with RBPJ(kappa)*. J Virol, 1996. 70(5): p. 3068-74.
104. Waltzer, L., et al., *Epstein-Barr virus EBNA3A and EBNA3C proteins both repress RBP-J kappa-EBNA2-activated transcription by inhibiting the binding of RBP-J kappa to DNA*. J Virol, 1996. 70(9): p. 5909-15.
105. Lemon, S.M., et al., *Replication of EBV in epithelial cells during infectious mononucleosis*. Nature, 1977. 268(5617): p. 268-70.
106. Greenspan, J.S., et al., *Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral "hairy" leukoplakia, an AIDS-associated lesion*. N Engl J Med, 1985. 313(25): p. 1564-71.
107. Montone, K.T., et al., *Identification of Epstein-Barr virus lytic activity in post-transplantation lymphoproliferative disease*. Mod Pathol, 1996. 9(6): p. 621-30.

108. Murray, P.G., et al., *BCL-2 but not its Epstein-Barr virus-encoded homologue, BHRF1, is commonly expressed in posttransplantation lymphoproliferative disorders*. *Blood*, 1996. 87(2): p. 706-11.
109. Oertel, S.H., et al., *Identification of early antigen BZLF1/ZEBRA protein of Epstein-Barr virus can predict the effectiveness of antiviral treatment in patients with post-transplant lymphoproliferative disease*. *Br J Haematol*, 2002. 118(4): p. 1120-3.
110. Takada, K. and Y. Ono, *Synchronous and sequential activation of latently infected Epstein-Barr virus genomes*. *J Virol*, 1989. 63(1): p. 445-9.
111. Lassoued, S., et al., *Transcription of the Epstein-Barr virus lytic cycle activator BZLF-1 during oxidative stress induction*. *Biol Trace Elem Res*, 2010. 137(1): p. 13-22.
112. Kim, J.A., et al., *Hypoxia-associated protein expression in primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma: does it predict prognosis?* *Leuk Lymphoma*, 2011. 52(2): p. 205-13.
113. Gargouri, B., et al., *Induction of Epstein-Barr virus (EBV) lytic cycle in vitro causes oxidative stress in lymphoblastoid B cell lines*. *Mol Cell Biochem*, 2009. 324(1-2): p. 55-63.
114. Tsai, D.E., et al., *EBV PCR in the diagnosis and monitoring of posttransplant lymphoproliferative disorder: results of a two-arm prospective trial*. *Am J Transplant*, 2008. 8(5): p. 1016-24.
115. Zacny, V.L., J. Wilson, and J.S. Pagano, *The Epstein-Barr virus immediate-early gene product, BRLF1, interacts with the retinoblastoma protein during the viral lytic cycle*. *J Virol*, 1998. 72(10): p. 8043-51.
116. Gutsch, D.E., K.B. Marcu, and S.C. Kenney, *The Epstein-Barr virus BRLF1 gene product transactivates the murine and human c-myc promoters*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 1994. 40(6): p. 747-60.

117. Kvensakul, M., et al., *Structural basis for apoptosis inhibition by Epstein-Barr virus BHRF1*. PLoS Pathog. 6(12): p. e1001236.
118. Hardwick, J.M., P.M. Lieberman, and S.D. Hayward, *A new Epstein-Barr virus transactivator, R, induces expression of a cytoplasmic early antigen*. J Virol, 1988. 62(7): p. 2274-84.
119. Hong, G.K., et al., *Epstein-Barr virus lytic infection is required for efficient production of the angiogenesis factor vascular endothelial growth factor in lymphoblastoid cell lines*. J Virol, 2005. 79(22): p. 13984-92.
120. Wang, E.S., et al., *Targeting autocrine and paracrine VEGF receptor pathways inhibits human lymphoma xenografts in vivo*. Blood, 2004. 104(9): p. 2893-902.
121. Dankbar, B., et al., *Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma*. Blood, 2000. 95(8): p. 2630-6.
122. Tanner, J. and G. Tosato, *Impairment of natural killer functions by interleukin 6 increases lymphoblastoid cell tumorigenicity in athymic mice*. J Clin Invest, 1991. 88(1): p. 239-47.
123. Hinrichs, C., et al., *IL-6 and IL-10 in post-transplant lymphoproliferative disorders development and maintenance: a longitudinal study of cytokine plasma levels and T-cell subsets in 38 patients undergoing treatment*. Transpl Int. 24(9): p. 892-903.
124. Jones, R.J., et al., *Roles of lytic viral infection and IL-6 in early versus late passage lymphoblastoid cell lines and EBV-associated lymphoproliferative disease*. Int J Cancer, 2007. 121(6): p. 1274-81.
125. Rai, D., et al., *Coordinated expression of microRNA-155 and predicted target genes in diffuse large B-cell lymphoma*. Cancer Genet Cytogenet, 2008. 181(1): p. 8-15.
126. Tam, W., *Identification and characterization of human BIC, a gene on chromosome 21 that encodes a noncoding RNA*. Gene, 2001. 274(1-2): p. 157-67.

127. Costinean, S., et al., *Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(18): p. 7024-9.
128. Linnstaedt, S.D., et al., *Virally induced cellular microRNA miR-155 plays a key role in B-cell immortalization by Epstein-Barr virus*. J Virol, 2010. 84(22): p. 11670-8.
129. Fischer, L., et al., *Differential micro-RNA expression in primary CNS and nodal diffuse large B-cell lymphomas*. Neuro Oncol, 2011.
130. Godshalk, S.E., S. Bhaduri-McIntosh, and F.J. Slack, *Epstein-Barr virus-mediated dysregulation of human microRNA expression*. Cell Cycle, 2008. 7(22): p. 3595-600.
131. He, L., et al., *A microRNA polycistron as a potential human oncogene*. Nature, 2005. 435(7043): p. 828-33.
132. Thapa, D.R., et al., *Overexpression of microRNAs from the miR-17-92 paralog clusters in AIDS-related non-Hodgkin's lymphomas*. PLoS One, 2011. 6(6): p. e20781.
133. Olive, V., et al., *miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92*. Genes Dev, 2009. 23(24): p. 2839-49.
134. Medina, P.P., M. Nolde, and F.J. Slack, *OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma*. Nature, 2010. 467(7311): p. 86-90.
135. Bai, H., et al., *Involvement of miR-21 in resistance to daunorubicin by regulating PTEN expression in the leukaemia K562 cell line*. FEBS Lett, 2011. 585(2): p. 402-8.
136. Loffler, D., et al., *Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer*. Blood, 2007. 110(4): p. 1330-3.
137. Fujita, S., et al., *miR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism*. J Mol Biol, 2008. 378(3): p. 492-504.

138. Flemington, E. and S.H. Speck, *Epstein-Barr virus BZLF1 trans activator induces the promoter of a cellular cognate gene, c-fos*. J Virol, 1990. 64(9): p. 4549-52.
139. Seto, E., et al., *Micro RNAs of Epstein-Barr virus promote cell cycle progression and prevent apoptosis of primary human B cells*. PLoS Pathog, 2010. 6(8).
140. Kvansakul, M., et al., *Structural basis for apoptosis inhibition by Epstein-Barr virus BHRF1*. PLoS Pathog, 2010. 6(12): p. e1001236.
141. Pritchett, R.F., S.D. Hayward, and E.D. Kieff, *DNA of Epstein-Barr virus. I. Comparative studies of the DNA of Epstein-Barr virus from HR-1 and B95-8 cells: size, structure, and relatedness*. J Virol, 1975. 15(3): p. 556-9.
142. Forman, J.J., A. Legesse-Miller, and H.A. Coller, *A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(39): p. 14879-84.
143. Kumar, M.S., et al., *Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis*. Nat Genet, 2007. 39(5): p. 673-7.
144. Karube, Y., et al., *Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients*. Cancer Sci, 2005. 96(2): p. 111-5.
145. Mishima, T., et al., *RT-PCR-based analysis of microRNA (miR-1 and -124) expression in mouse CNS*. Brain Res, 2007. 1131(1): p. 37-43.
146. Zhang, M.C., et al., *[Knockdown and overexpression of miR-219 lead to embryonic defects in zebrafish development]*. Fen Zi Xi Bao Sheng Wu Xue Bao, 2008. 41(5): p. 341-8.
147. Gabriely, G., N.M. Teplyuk, and A.M. Krichevsky, *Context effect: microRNA-10b in cancer cell proliferation, spread and death*. Autophagy, 2011. 7(11).

148. Li, G., et al., *MicroRNA-10b induced by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 promotes the metastasis of human nasopharyngeal carcinoma cells*. *Cancer Lett*, 2010. 299(1): p. 29-36.
149. Sasayama, T., et al., *MicroRNA-10b is overexpressed in malignant glioma and associated with tumor invasive factors, uPAR and RhoC*. *Int J Cancer*, 2009. 125(6): p. 1407-13.
150. Setoyama, T., et al., *MicroRNA-10b - a new marker or the marker of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma?* *Clin Cancer Res*, 2011.
151. Ma, L., J. Teruya-Feldstein, and R.A. Weinberg, *Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer*. *Nature*, 2007. 449(7163): p. 682-8.
152. Orom, U.A., F.C. Nielsen, and A.H. Lund, *MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation*. *Mol Cell*, 2008. 30(4): p. 460-71.
153. Kondoh, N., et al., *Enhanced expression of S8, L12, L23a, L27 and L30 ribosomal protein mRNAs in human hepatocellular carcinoma*. *Anticancer Res*, 2001. 21(4A): p. 2429-33.
154. Zhai, W. and L. Comai, *Repression of RNA polymerase I transcription by the tumor suppressor p53*. *Mol Cell Biol*, 2000. 20(16): p. 5930-8.
155. Boon, K., et al., *N-myc enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis and protein synthesis*. *EMBO J*, 2001. 20(6): p. 1383-93.
156. Ballabio, E., et al., *MicroRNA expression in Sezary syndrome: identification, function, and diagnostic potential*. *Blood*, 2010. 116(7): p. 1105-13.
157. Richard, D.E., E. Berra, and J. Pouyssegur, *Angiogenesis: how a tumor adapts to hypoxia*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. 266(3): p. 718-22.

158. Sang, N., et al., *MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300*. J Biol Chem, 2003. 278(16): p. 14013-9.
159. Zundel, W., et al., *Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression*. Genes Dev, 2000. 14(4): p. 391-6.
160. Rane, S., et al., *Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1alpha and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes*. Circ Res, 2009. 104(7): p. 879-86.
161. Wang, C., et al., *Underexpressed microRNA-199b-5p targets Hypoxia-Inducible Factor-1alpha in hepatocellular carcinoma and predicts prognosis of HCC patients*. J Gastroenterol Hepatol, 2011.
162. Chen, S. and N. Sang, *Histone deacetylase inhibitors: the epigenetic therapeutics that repress hypoxia-inducible factors*. J Biomed Biotechnol, 2011. 2011: p. 197946.
163. Kassam, S., et al., *Methylseleninic acid inhibits HDAC activity in diffuse large B-cell lymphoma cell lines*. Cancer Chemother Pharmacol, 2011.
164. Chen, R., et al., *Regulation of IKKbeta by miR-199a affects NF-kappaB activity in ovarian cancer cells*. Oncogene, 2008. 27(34): p. 4712-23.
165. Staudt, L.M., *Oncogenic activation of NF-kappaB*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. 2(6): p. a000109.
166. Calado, D.P., et al., *Constitutive canonical NF-kappaB activation cooperates with disruption of BLIMP1 in the pathogenesis of activated B cell-like diffuse large cell lymphoma*. Cancer Cell, 2010. 18(6): p. 580-9.
167. Chen, R., et al., *Inflammation, cancer and chemoresistance: taking advantage of the toll-like receptor signaling pathway*. Am J Reprod Immunol, 2007. 57(2): p. 93-107.

168. Wang, C.Y., et al., *Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB*. Nat Med, 1999. 5(4): p. 412-7.
169. Sachdeva, M., et al., *p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(9): p. 3207-12.
170. Akao, Y., et al., *Downregulation of microRNAs-143 and -145 in B-cell malignancies*. Cancer Sci, 2007. 98(12): p. 1914-20.
171. Kitade, Y. and Y. Akao, *MicroRNAs and their therapeutic potential for human diseases: microRNAs, miR-143 and -145, function as anti-oncomirs and the application of chemically modified miR-143 as an anti-cancer drug*. J Pharmacol Sci, 2010. 114(3): p. 276-80.
172. Li, L.M., et al., *Role of microRNA-214-targeting phosphatase and tensin homolog in advanced glycation end product-induced apoptosis delay in monocytes*. J Immunol, 2011. 186(4): p. 2552-60.
173. Jindra, P.T., et al., *Costimulation-dependent expression of microRNA-214 increases the ability of T cells to proliferate by targeting Pten*. J Immunol, 2010. 185(2): p. 990-7.
174. Gironella, M., et al., *Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(41): p. 16170-5.
175. Cano, C.E., et al., *Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 is a major mediator of p53 antioxidant function*. Cancer Res, 2009. 69(1): p. 219-26.

Erklärung

„Ich, Susanne Elfriede Käthe Fink, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „EPSTEIN BARR VIRUS SPEZIFISCHE PROTEIN- UND MICRORNA-EXPRESSIONSPROFILE BEI PRIMÄR CEREBRALEN PTLD“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsverzeichnis

1. Trappe R, Zimmermann H, Fink S, Reinke P, Dreyling M, Pascher A, et al. Plasmacytoma-like post-transplant lymphoproliferative disorder, a rare subtype of monomorphic B-cell post-transplant lymphoproliferation, is associated with a favorable outcome in localized as well as in advanced disease: a prospective analysis of 8 cases. *Haematologica*. Jul;96(7):1067-71.
2. Nourse JP, Crooks P, Keane C, Nguyen-Van D, Mujaj S, Ross N, Ross N, Jones K, Vari F, Han E, Trappe R, Fink S, Gandhi MK. Expression profiling of Epstein-Barr virus-encoded microRNAs from paraffin-embedded formalin-fixed primary Epstein-Barr virus-positive B-cell lymphoma samples. *J Virol Methods*. Sep;184(1-2):46-54.
3. Zimmermann H, Oschlies I, Fink S, Pott C, Neumayer HH, Lehmkuhl H, et al. Plasmablastic posttransplant lymphoma: cytogenetic aberrations and lack of Epstein-Barr virus association linked with poor outcome in the prospective German Posttransplant Lymphoproliferative Disorder Registry. *Transplantation*. Mar 15;93(5):543-50.