

1. Einleitung

1.1. Epstein-Barr-Virus

1.1.1. Entdeckung des Epstein-Barr-Virus

1958 beschrieb Dennis Burkitt erstmals ein Lymphom, welches gehäuft („endemisch“) in den tropischen Regionen Ugandas auftrat¹. Schon damals wurde eine infektiöse Genese dieses Tumors vermutet. 1964 entdeckten Epstein, Achong und Barr in der Zellkultur dieses nach dem Erstbeschreiber benannten Burkitt-Lymphoms mittels Elektronenmikroskopie ein Virus. Es sollte sich als ein bislang nicht beschriebenes Herpes-Virus herausstellen und das erste humane Tumor-Virus sein, das identifiziert werden konnte². Epstein, Achong und Barr konnten das Virus in allen Zellen dieses Lymphoms und in allen Fällen dieses endemischen Typs nachweisen und postulierten einen Zusammenhang zwischen der Infektion und der Entstehung des Tumors. Nach Epstein und Barr wurde dieses Virus als „Epstein-Barr-Virus“ (EBV) oder auch „Humanes Herpesvirus 4“ benannt.

1965 beschrieben Dorfmann und Wright in den USA und Großbritannien Lymphome, die dem endemischen afrikanischen Burkitt-Lymphom morphologisch vollständig glichen^{3,4}. Lediglich in der Lokalisation und in den epidemiologischen Eigenschaften unterschieden sich diese Tumoren von ihren afrikanischen Äquivalenten. Später sollte sich herausstellen, dass auch diese Tumoren mit EBV vergesellschaftet sind, jedoch sehr viel seltener als der afrikanische Typ^{5,6}.

Drei Jahre später, 1968, wurde EBV als Erreger der Infektiösen Mononukleose (IM) identifiziert⁷. Die technischen Assistentinnen im Labor der Entdecker dienten hier als unfreiwillige Versuchsobjekte, indem sie sich während der Arbeit mit infektiösem Material infizierten und an IM erkrankten. In den 80er Jahren schließlich fand man das Virus durch

verbesserte Nachweisverfahren gehäuft in Non-Hodgkin-Lymphomen und oraler haariger Leukoplakie von AIDS-Erkrankten^{8,9}.

Seither konnte das EBV in unterschiedlicher Häufigkeit und unterschiedlichen epidemiologischen Zusammenhängen in zahlreichen weiteren malignen Erkrankungen nachgewiesen werden.

1.1.2. Krankheitsbilder

EBV tritt ubiquitär auf. Insgesamt sind mehr als 90% aller Menschen weltweit mit EBV infiziert¹⁰. EBV wird hauptsächlich durch den Speichel übertragen. Der Weg über Blutprodukte, Knochenmark- und Organtransplantationen ist ebenfalls beschrieben¹¹.

Bei der Beschreibung der mit EBV assoziierten Erkrankungen kann man zwei verschiedene Szenarien voneinander abgrenzen: Die Primärinfektion mit dem Virus einerseits und andererseits Erkrankungen, die nach einer latenten Infektion mit EBV in Verbindung gebracht werden.

Findet die Primärinfektion in jungen Jahren statt, zeigen sich in der Regel keine oder nur unspezifische Krankheitssymptome. Anders hingegen, wenn sich die Primärinfektion bis ins Jugend- oder frühe Erwachsenenalter hin verschiebt, wie das in entwickelten Ländern häufig der Fall ist. In diesen Ländern findet die Primärinfektion mit EBV häufig im Pubertätsalter statt, in dem junge Erwachsene die Grenze des Körperkontaktes über ihre Familie hinaus ausweiten und sich so durch Speichelkontakt infizieren. Dann kann ein als „Infektiöse Mononukleose“ (IM) oder „Pfeiffersches Drüsenfieber“ bezeichnetes Krankheitsbild auftreten, welches wegen des Übertragungsweges passenderweise auch „kissing disease“ genannt wird¹².

In den letzten Jahren wiesen serologische und molekularbiologische Erkenntnisse zunehmend in die Richtung, dass das Epstein-Barr-Virus mit zahlreichen malignen Erkrankungen assoziiert ist. Neben dem Burkitt Lymphom werden nun auch andere Non-Hodgkin-Lymphome (bei intaktem und eingeschränktem Immunsystem), der M. Hodgkin, Nasopharynxkarzinome, lymphoepitheliale Tumoren, Magenkarzinome und

Leiomyosarkome bei Immunsuppression pathogenetisch mit EBV in Verbindung gebracht.

1.1.2.1. Infektiöse Mononukleose

Abhängig von soziokulturellen Umständen gibt es gravierende Unterschiede im Zeitpunkt der Primärinfektion mit EBV. In Regionen mit schlechten hygienischen Verhältnissen und engem zwischenmenschlichen Kontakt bei beengten Wohnverhältnissen, findet die Primärinfektion schon sehr früh im Kindesalter statt. So konnte beispielsweise in Uganda gezeigt werden, dass über 80% der Kinder schon vor dem ersten Lebensjahr mit EBV infiziert sind¹³. In entwickelten Ländern verzögert sich die Infektion hingegen. Beispielsweise sind in den USA nur 45% der Kinder im Alter von einem Jahr seropositiv¹⁴. Die Bedeutung dieser unterschiedlichen Zeitpunkte liegt in der veränderten Symptomatologie der Infektion in Abhängigkeit vom Alter bei der Primärinfektion. Infektionen im frühen Kindesalter sind in der Regel asymptomatisch oder zeigen nur unspezifische Symptome einer Atemwegserkrankung¹⁵. Je mehr sich die Infektion jedoch bis zum höheren Kindes- oder Jugendalter verschiebt, um so höher ist die Wahrscheinlichkeit, eine symptomatische Erkrankung in Form der Infektiösen Mononukleose (IM) zu entwickeln. Je nach Untersuchung zeigt sich dieses Krankheitsbild dann bei 25% bis 75% der Infizierten^{12,16,17}. Die Erkrankung zeigt eine typische Symptomtrias aus fieberhafter Angina tonsillaris/Pharyngitis, Lymphknotenschwellung und typischem Blutbild mit mononukleären Zellen und Virozyten (Reizformen der T-Lymphozyten). Komplikationen wie Splenomegalie, petechiale Blutungen am Gaumen und Hepatomeglie kommen jeweils in 10% der Fälle vor. Seltene Komplikationen sind die hämolytische Anämie, Thrombozytopenie, aplastische Anämie, Myokarditis, Hepatitis, genitale Ulcerationen, Milzrupturen, Hautausschlag, neurologische Komplikationen (Guillain-Barré-Syndrom, Enzephalitis, Meningitis).

Die meisten der Symptome der IM lassen sich durch die Proliferation von T-Zellen als Immunantwort auf die Infektion erklären. Obwohl die T-Zell-

Immunantwort entscheidend für die Kontrolle der Infektion ist, gibt es zusätzlich noch eine humorale Immunantwort: Aktivierte B-Zellen produzieren polyklonale Antikörper gegen virale Proteine¹⁸.

1.1.2.2. EBV und Lymphome

1.1.2.2.1. EBV und Burkitt-Lymphom

Das Burkitt-Lymphom (BL) ist ein hochmalignes B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom (B-NHL) mit charakteristischen Eigenschaften. Die dicht liegenden Tumorzellen bilden einen monomorphen Zellrasen. Es gehört zu den schnellstwachsenden Tumoren überhaupt. Zahlreiche Apoptosen und die charakteristischen Kerntrümmer-Makrophagen („Sternhimmel-Makrophagen“) zeigen, dass zugleich ein Teil der Tumorzellen untergeht.

In Abhängigkeit von Klinik, Assoziation mit EBV, geographischen Besonderheiten und Kofaktoren unterscheidet man drei Typen des BL:

1. Endemisches BL
2. Sporadisches BL
3. AIDS-assoziiertes BL

Eine Form des BL, das endemische BL, war der erste Tumor, dessen Genese mit EBV in Verbindung gebracht wurde. Es tritt in bestimmten Gebieten Zentralafrikas, Lateinamerikas und Papua Neu-Guineas auf¹⁵. Betroffen sind hauptsächlich Kinder, bei denen der Tumor klassischerweise in der Kieferregion wächst. Studien aus den 70er Jahren zeigten den deutlichen Zusammenhang zwischen EBV und dieser Tumorentität^{19,20}. In diesen Untersuchungen konnten 93-98% aller Fälle als EBV-positiv identifiziert werden. In den Fällen mit EBV-Nachweis konnte das Virus in allen neoplastischen Zellen nachgewiesen werden²¹. Die regelmäßige Infektion der Tumorzellen mit EBV spricht für eine möglicherweise wichtige Rolle des Virus bei der Genese dieses Tumors. So ist bei Kindern aus Uganda gezeigt worden, dass ein erhöhter Titer gegen EBV-

Strukturproteine mit einem erhöhten Risiko einhergeht, am BL zu erkranken²².

In anderen als den oben genannten Regionen kommt der Tumor nur „sporadisch“ vor. Histopathologisch gleichen sich die Typen, der sporadische unterscheidet sich durch die Lokalisation (Abdomen versus Kiefer), das seltenere Auftreten, größere Variabilität des Lebensalters bei Diagnose, höhere Prävalenz bei Weißen und durch geringere Assoziation mit EBV-Infektion vom endemische Typ²³. Während die Tumorzellen des endemischen BL nahezu immer EBV-positiv sind, schwankt die EBV-Infektionsrate beim sporadischen Typ zwischen 15 und 88% der Fälle^{5,6}. Die AIDS-assoziierten BL sind über 1000 mal häufiger als die nicht AIDS-assoziierten sporadischen Formen. Im Gegensatz zu den anderen HIV-assoziierten NHL treten sie schon früh im Verlauf der HIV-Immundefizienz auf²⁴. Je nach Entität sind 17% bis über 90% der Fälle EBV-infiziert²⁵.

In den Zellen des BL findet man typische Chromosomentranslokationen: t(8;14) oder t(8;22) oder t(8;2). Bei diesen Translokationen wird die ursprüngliche Position des Onkogens *c-myc* auf dem Chromosom 8 verändert. Es gelangt entweder auf das Chromosom 14 in die Nähe des Gens für die konstante Region der schweren Kette des Immunglobulins, oder auf die Chromosomen 2 oder 22 in die Nähe des Immunglobulinleichtkettenloci. Durch diesen Positionswechsel wird die Regulation des Onkogens entkoppelt, eine vermehrte Expression von *c-myc* führt zu einer Proliferation der betroffenen Zellen, welches eine maligne Entartung der Zellen begünstigt²⁶.

1.1.2.2.2. EBV und Morbus Hodgkin

Der M. Hodgkin (Hodgkin's Disease, HD) zeichnet sich durch spezifische histologische Eigenschaften aus: In einem entzündlichen Infiltrat liegen die wenigen malignen mehrkernigen Sternberg-Reed-Riesenzellen (RS-Zellen) und die großen einzellige Hodgkin-Zellen.

In 40-60% der Hodgkin-Fälle findet man EBV in den Reed-Sternberg-Zellen. In den EBV-positiven Fällen sind immer alle RS-Zellen des Lymphoms mit EBV infiziert²⁷. Die Hypothese eines Zusammenhanges zwischen EBV und der Genese des M. Hodgkin wird neben der genannten Infektionsrate noch durch andere Beobachtungen gestützt: Patienten mit M. Hodgkin haben höhere Antikörpertiter gegen bestimmte EBV-Antigene als EBV-positive Kontrollpersonen ohne M. Hodgkin. Weiterhin ist eine Infektion mit EBV mit einem 3-4 mal höheren Risiko korreliert, an M. Hodgkin zu erkranken²⁸.

1.1.2.2.3. Non-Hodgkin-Lymphome bei Immunkompetenten

Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) treten mit einer Inzidenz von 4-6 pro 100.000 Personen pro Jahr auf. Entsprechend ihres zellulären Ursprungs unterteilt man sie in B- und T-Zell-NHL (B-NHL und T-NHL).

Nur ein geringer Teil der NHL bei Immunkompetenten ist mit einer EBV-Infektion assoziiert (im Gegensatz zu Patienten mit Immundefizit, siehe unten). Die einzige Ausnahme bildet das endemische BL, welches, wie oben besprochen, regelmäßig mit EBV assoziiert ist.

Je nach Untersucher schwanken die Angaben über EBV-Infektion bei NHL. Bezüglich der B-NHL werden Zahlen zwischen 2%²⁹ und 13% der Fälle³⁰ genannt. Hummel *et al.* konnten einen Unterschied in der EBV-Infektionsrate zwischen höher- und niedrigmalignen Lymphomen nachweisen³⁰. Höhermaligne Lymphome waren dreimal häufiger mit EBV infiziert als die niedrigmalignen.

T-NHL sind häufiger mit EBV assoziiert. Hier werden abhängig von den Entitäten Raten zwischen 80 - 85% der Fälle von angioimmunoblastischen (lymphadenopathy-type) T-Zell-Lymphomen und 31 - 36% der pleomorphen T-Zell-Lymphome genannt³¹.

1.1.2.2.4. Non-Hodgkin-Lymphome bei Immunsupprimierten

Im Spätstadium der AIDS-Erkrankung kann es zu v.a. immunoblastischen Lymphomen und Lymphomen des ZNS kommen. Es sind großzellige Lymphome, mittel- oder hochmaligne, die häufig extranodal vorkommen³².

Ca. 90% dieser ZNS-Lymphome und bis zu 70% der immunoblastischen Lymphome sind EBV-positiv²⁵. In den EBV-positiven immunoblastischen Lymphomen sind alle Tumorzellen infiziert³³. Im Frühstadium der Erkrankung vor dem Auftreten eines schweren Immundefizits findet man gehäuft Lymphome vom Burkitt-Typ. Sie zeigen in der Regel eine c-myc-Translokation.

Bei iatrogener Immunsuppression, z. B. nach Transplantationen, kann es zu EBV-assoziierten Lymphoproliferationen kommen („post-transplantant lymphoproliferative disorder“, PTLPD). Hierbei handelt es sich in der Regel um hochmaligne immunoblastische Lymphome. Sie unterscheiden sich von Lymphomen Immunkompetenter durch ein häufigeres Auftreten im ZNS und durch nicht nachweisbare Klonalität³⁴. In über 95% der Fälle sind diese Tumoren EBV-positiv³⁵.

1.1.2.3. EBV und epitheliale Tumoren

1.1.2.3.1. EBV und Nasopharynx-Karzinom

Das Nasopharynx-Karzinom (nasopharyngeal carcinoma, NPC) ist ein Tumor, den man häufig im südlichen China, Nordafrika und bei den Eskimos in Alaska findet. Die Inzidenz in Südchina liegt bei 50 pro 100.000 Personen pro Jahr³⁶. Sporadisch findet man das Karzinom auch in Westeuropa und den USA.

Das NPC entsteht aus den Epithelzellen des Nasopharynx. Man unterscheidet drei histologische Typen:

- Plattenepithelzell-Typ (nach WHO Typ I)
- Nicht-keratinisierender Typ (nach WHO Typ II)
- Undifferenzierter Typ (nach WHO Typ III)

Nahezu alle Karzinome der Typen II und III enthalten EBV in den transformierten Epithelzellen³⁷, nicht aber in den Lymphozyten innerhalb des Tumors. Schon in den Frühstadien des Tumors (Carcinoma in situ) findet man EBV in den Epithelzellen. Dies lässt eine Infektion der Zellen vor der malignen Entartung vermuten³⁸.

1.1.2.3.2. EBV und Magenkarzinome

Das Magenkarzinom ist ein häufiger Tumor in China und Japan, deutlich seltener kommt er in Westeuropa und den USA vor. Seine Inzidenz hat in Asien in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich abgenommen³⁹. Ca. 95% dieser Karzinome sind Adenokarzinome. In ca. 10% der Magenkarzinome findet man EBV. Die Zahlen diesbezüglich schwanken jedoch abhängig von den untersuchten Populationen⁴⁰⁻⁴².

1.1.3. EBV: Molekulare Eigenschaften

Das Epstein-Barr-Virus gehört zu der Familie der Herpesviren. Seine DNA ist von einer Kapsel umschlossen, welche wiederum von der Virushülle umgeben ist. Das Genom umfasst etwa 172 000 Basenpaare, die für ca. 100 Gene kodieren können (s. Abb. A). Man unterscheidet zwei Untergruppen des EBV: Typ 1 und Typ 2. Sie unterscheiden sich nur in den Sequenzen der nukleären Proteine (EBV-encoded nuclear antigens, EBNA-2, -3A, 3B und 3C). Prinzipiell findet man beide Typen des Virus weltweit, es zeigen sich jedoch bestimmte Prävalenzen: EBV Typ 1 findet sich häufiger in entwickelten Länder, Typ 2 in Afrika und bei Patienten mit AIDS¹⁵. Typ 1 kann effizienter B-Zellen immortalisieren, man vermutet, dass Typ 2 dazu nur bei immundefizienten Individuen in der Lage ist⁴³.

Man unterscheidet zwei Formen der EBV-Infektion: Die lytische und die latente Infektion. Nach der Primärinfektion kommt es zunächst zur lytischen Infektion, die in eine latente Phase übergeht. Diese latente

Phase kann lebenslang stabil persistieren, aber auch zu einer erneuten lytischen Phase reaktiviert werden.

1.1.3.1. Die lytische Phase

Primär infiziert das EBV B-Lymphozyten im Epithel des Pharynx⁴⁴. Die Infektion erfolgt wahrscheinlich durch die Bindung eines Glykoproteins der Virushülle (gp350/220) an den CD21-Rezeptor auf der Oberfläche der B-Zelle⁴⁵. Nach der Infektion der B-Zelle wird die DNA zum Zellkern transportiert und dort schließen sich die Enden der zuvor linearen DNA zu einem ringförmigen Genom (Episom) zusammen. Dieses Episom verbleibt meist als extrachromosomale genetische Information im Zellkern⁴⁶. Auf die primäre Infektion der B-Zellen folgt eine rasche Vermehrung der infizierten Zellen, durch die Zelllyse werden Viren freigesetzt, die weitere B-Zellen infizieren. Das Immunsystem des Wirtes reagiert auf die Infektion mit einer EBV-spezifischen cytotoxischen-T-Zell-Reaktion (natürliche Killer-Zellen, CD4+ und CD8+ cytotoxische T-Zellen)⁴⁷, wodurch die Vermehrung der infizierten Zellen gestoppt wird; das Virus verbleibt aber trotzdem lebenslang in einigen B-Zellen (latente Infektion).

1.1.3.2. Die latente Phase

Während dieser latenten Phase der Infektion sind ca. 1 pro 10⁶ der zirkulierenden B-Zellen infiziert⁴⁸. In Form dieser latenten Infektion persistiert das Virus lebenslang in den infizierten Zellen des Wirtes. In einigen der latent infizierten B-Zellen kann es intermittierend zu einer Reaktivierung und Weiterverbreitung des Virus auf andere Wirte kommen.

Die wichtigsten viralen Genprodukte sind

- Sechs nukleäre Proteine (EBV nuclear antigens): EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C und -EBNA-LP (leader proteine)
- Drei latente Membranproteine: LMP-1, -2A und -2B
- Zwei nicht-translatierte RNA: EBER-1 und -2 (Epstein-Barr encoded RNA)

Diesen Genprodukten können bestimmte Funktionen zugeordnet werden:

- **LMP-1** spielt möglicherweise eine wichtige Rolle bei der malignen Transformation von Zellen⁴⁹ und kann das Zell-Überleben verlängern⁵⁰. Über zahlreiche Interaktionen mit zellulären Proteinen werden verschiedene Veränderungen in den infizierten Zellen ausgelöst^{51,52}.
- **LMP-2** verhindert die Aktivierung der latenten Infektion zur lytischen⁵³.
- **EBNA-1** bindet sich an die virale DNA und führt zur initialen Replikation des Virus. Es sichert den Verbleib des Genoms in der Zelle als zirkuläres Episom⁵⁴, die Plasmid-Replikation und die gleichmäßige Verteilung der EBV-Episome auf die Tochterzellen¹⁵.
- **EBNA-2** steigert die Expression von LMP-1 und LMP-2⁵⁵.
- **EBNA-2, -3A, -3C** sind nötig für B-Zell-Wachstum und -Transformation durch die Regulierung zellulärer Proteine (das Onkogen bcl-2, die Zelladhäsionsmoleküle LFA-1, LFA-2, LFA-3 und ICAM-1 und B-Zell-Aktivierungsantigen CD-23)⁵⁶.
- **EBNA-LP** verstärkt die Wirkung von EBNA-2 bei der Regulierung der LMP-1-Expression⁵⁷
- **EBER-1 und -2** sind zwei nicht-translatierte kleine virale RNAs (165 bzw. 169 Basen lang), die in großer Anzahl (bis 10^6 Kopien pro Zelle) im Zellkern vorliegen. Die genaue Funktion ist bislang unklar, für Proteine kodieren sie nicht. Studien haben gezeigt, dass die Expression der EBERs unabhängig vom Vorhandensein von EBV-Genom die Tumorentstehung fördert⁵⁸.

Anhand der Kombination der exprimierten EBV-Genprodukte in einer latent infizierten Zelle unterscheidet man verschiedene Latenzformen, welche wiederum den oben beschriebenen EBV-assoziierten Krankheitsbildern zugeordnet werden können (Tab. 1):

Tabelle 1: Formen der EBV-Infektion

Latenzform	Genprodukte	Erkrankung
Typ I	EBER I & II, EBNA-1	Burkitt´s Lymphom, Magenkarzinom
Typ II	EBER I & II, EBNA-1, LMP-1 u./o. LMP-2A u/o LMP-2B	Nasopharynx-Karzinom, M. Hodgkin, nasales T-/ natural killer-cell Lymphom
Typ III	Alle latenten Genprodukte (EBER I & II, EBNA-1, LMP-1, LMP-2A, LMP-2B, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, EBNA-LP)	AIDS-assoziierte NHL, Posttransplantationslymphome

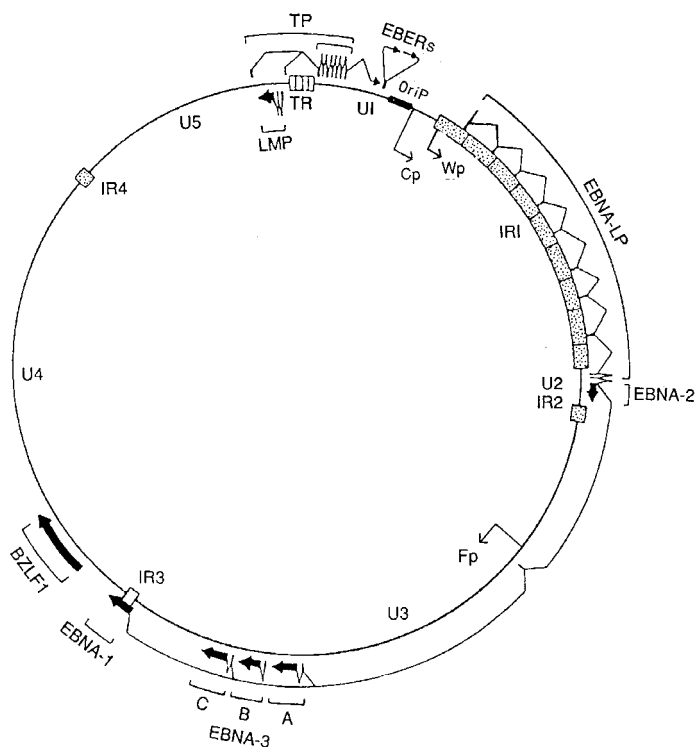


Abbildung A: Schematische Darstellung des EBV-Genoms

1.1.4. Nachweismethoden von Epstein-Barr-Virus

Es existieren unterschiedliche Ansätze, um EBV im Gewebe nachzuweisen: Es können Produkte des Virus nachgewiesen werden oder die virale DNA selbst. Der Nachweis kann „in situ“ stattfinden, also in einem Gewebeschnitt, oder „in vitro“, nach Zerstörung der morphologischen Struktur durch Extraktion des Gewebes.

Für den EBV-Nachweis **in situ** stehen folgende wichtige Methoden zur Verfügung: 1. Immunhistochemie und 2. in situ-Hybridisierung. Für den EBV-Nachweis **in vitro** ist die gängigste Methode die Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR), bei der EBV-DNA oder EBV-RNA gezeigt werden können. Daneben werden verschiedene Blotting-Verfahren angewendet.

1.1.4.1. In situ Nachweis von EBV

Ein in situ Nachweis von EBV bietet den Vorteil, dass die Morphologie der infizierten Zelle und des Gewebes erhalten bleibt und somit die infizierte Zelle selbst identifiziert und in ihrem Kontext zum benachbarten Gewebe beurteilt werden kann.

Für den in situ Nachweis von EBV haben sich zwei unterschiedliche Ansätze etabliert: Mittels Immunhistochemie können EBV-kodierten Proteine nachgewiesen werden. Dabei werden Proteine durch spezifische Antikörper detektiert, welche wiederum farblich sichtbar gemacht werden. Die zweite Methode ist die in situ-Hybridisierung (ISH) von Nukleinsäuren: Speziell synthetisierte, radioaktiv oder nicht-radioaktiv markierte Nukleinsäurestränge („Sonden“), die komplementär zu den nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen sind, paaren sich stabil („hybridisieren“) mit den entsprechenden Abschnitten dieser Zielnukleinsäuren und werden sichtbar gemacht. Bei dieser Methode muss eine hohe Kopienzahl der Zielnukleinsäuren in den Zellen vorliegen. Da bei allen Latenzformen der EBV-Infektion regelmäßig EBV-Moleküle in großer Zahl produziert werden, bietet sich diese RNA als Zielnukleinsäure („Template“) für die ISH an (EBER-ISH). So ist seit Anfang der 90er

Jahre⁵⁹ die nicht-radioaktive RNA-ISH für EBER die Methode der Wahl. Darüber hinaus ist auch die DNA-ISH mit dem EBV-Epimom selbst als Template eine etablierte Methode⁶⁰. Der Vorteil der ISH liegt darin, dass die infizierte Zelle in ihrer Morphologie und ihrem Verhältnis zum umgebenden Gewebe beurteilt werden kann.

Vergleicht man Immunhistochemie und ISH als Nachweismethoden für EBV, so erweist sich die ISH als deutlich sensitiver, allerdings auch technisch aufwändiger.

In der Literatur über EBV wird in der Regel der Nachweis von EBER in Zellen gleichgesetzt mit einer EBV-Infektion dieser Zellen. Dies liegt nahe, denn wie oben erwähnt finden sich die EBERs in allen bislang beschriebenen Latenzformen in großer Menge. Trotz der praktischen Nachvollziehbarkeit dieser Gleichsetzung handelt es sich hier jedoch nicht nur um eine sprachliche, sondern auch um eine inhaltliche Ungenauigkeit. Zum einen ist es nicht sicher gezeigt, dass ein fehlender Nachweis von EBER zwangsläufig auch ein Fehlen von EBV bedeutet. Umgekehrt ist es zumindest experimentell möglich, in Zellkulturen durch Transfektion des kodierenden Genabschnitts eine EBER-Expression in EBV-negativen Zellen zu induzieren⁵⁸. Im Folgenden wird daher explizit zwischen „EBER-Expression“ und „EBV-Infektion“ unterschieden.

1.1.4.2. In vitro Nachweis von EBV

Für den in vitro Nachweis von EBV hat sich die Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase chain reaction, PCR) durchgesetzt. Bei dieser Methode können spezifische DNA- oder RNA-Abschnitte auf so große Anzahl vervielfältigt („amplifiziert“) werden, dass sie sich mit sehr einfachen Verfahren darstellen lassen. Im Gegensatz zu vielen „single copy genes“ macht sich im Falle des EBV eine Eigenschaft des Genoms positiv bemerkbar: Die Enden des Genoms enthalten „terminale repetitive Sequenzen“ (terminal repeats, TR), in denen eine Anzahl von immer gleichen Genabschnitten hintereinander geschaltet sind. Wählt man nun die zu amplifizierende Sequenz innerhalb dieser terminalen Repeats, so

stehen für die PCR mehrere Kopien des Templates innerhalb eines Genoms zur Verfügung.

Nach DNA-Extraktion aus Gewebematerial ist mittels EBV-PCR ein hochsensitiver Nachweis von nur wenigen EBV-Genomen möglich, so dass auch einzelne EBV-infizierte Zellen in einem Zellextrakt nachgewiesen werden können. Allerdings ist es bei dieser Vorgehensweise nicht möglich, die morphologischen Eigenschaften der infizierten Zelle zu beschreiben. Auch eine Beurteilung der Anzahl EBV-infizierter Zellen ist nicht möglich.

1.2. Unterschiedliche EBER-Expressionsmuster bei den EBV-assoziierten Tumoren

Durch EBER-ISH-Untersuchungen zahlreicher Tumoren hat man verschiedene Formen der EBER-Expressionsmuster gefunden. Es gibt Tumorentitäten wie das endemische BL, bei dem **nahezu alle Fälle** EBER exprimieren und in diesen EBER-positiven Fällen EBER in **allen Tumorzellen** vorkommt^{21,61}.

Daneben gibt es Tumorentitäten wie z.B. den M. Hodgkin, bei denen **nur in einem Teil der Fälle** (40-60%) EBER in den Tumorzellen (RS-Zellen) exprimiert wird. In diesen EBER-positiven Fällen sind immer **alle RS-Zellen des Lymphoms** EBER-positiv^{27,62}.

Im Gegensatz zu den beiden oben genannten Entitäten ist das Bild bei den **Non-Hodgkin-Lymphomen** weniger einheitlich: Nur **2-13% der B-NHL** weisen eine EBER-Expression in den Tumorzellen auf. Bei den T-NHL sind es mehr (31 – 85% der Fälle, je nach Entität, siehe auch Abschnitt 1.1.2.2.3). Bislang ging man davon aus, dass bei den EBER-positiven NHL auch immer alle Tumorzellen EBER exprimierten. Bei der Untersuchung einer großen Anzahl von Non-Hodgkin-Lymphomen beschrieben Hummel *et al*³⁰ 1995 jedoch einen unerwarteten Befund: Unter den 27 EBER-positiven Tumoren fanden sich 10 Lymphome, bei denen **nur ein Teil der Tumorzellen** EBER-positiv waren (partielle EBER-Positivität). Die Autoren bemaßen diesem Befund erstmals eine über technische Probleme hinausgehende Bedeutung zu und diskutierten verschiedene Hypothesen,

um dieses Phänomen zu erklären. Sie favorisierten die Hypothese, dass ein Teil der Tumorzellen nachträglich mit EBV infiziert wurde. Weitere Erklärungsmodelle wurden als zweifelhaft diskutiert: 1. Ein Verlust von EBV aus einigen Zellen sowie eine 2. Herunterregulierung von EBER bei unverändertem EBV-Bestand in den Zellen beurteilten sie als unwahrscheinlich, da solche Phänomene bis dahin nicht in der Literatur beschrieben worden waren. 3. Eine Zusammensetzung dieser Tumoren aus EBV-infizierten und EBV-negativen Klonen schlossen sie aus, da die meisten B-NHL nachweislich monoklonal sind⁶³.

Die bemerkenswerten Befunde dieser Studie bilden Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit.

Später beschrieben auch andere Autoren Lymphome, bei denen nur ein Teil der Tumorzellen EBER-positiv waren: So beschrieben D'Amore *et al.*³¹ den EBER-Status von B- und T-NHL. 25 von 374 (7%) B-NHL waren EBER-positiv. Zwei davon waren vollständig EBER-positiv, vier waren z.T. EBER-positiv, 19 enthielten nur einige verstreute EBER-positive Tumorzellen. Auch bei den T-Zell-Lymphomen gab es EBER-positive Fälle, die EBER nur in einem Teil der Tumorzellen exprimierten.

Wie bei den Lymphomen wurden auch bei den EBV-assoziierten **Magenkarzinomen** in der Literatur Fälle beschrieben, in denen nur ein Teil der Tumorzellen EBER exprimieren. Yuen *et al.*⁶⁴ fanden bei sieben von 74 untersuchten Magenkarzinomen eine EBV-Assoziation. In einem dieser Fälle fanden sie in dem den Tumor umgebenden dysplastischen Epithel nebeneinander stehend Inseln mit EBER-positiven Drüsen und Inseln mit EBER-negativen Drüsen. Die Autoren vermuten eine EBV-Infektion einiger Zellen in der dysplastischen Phase der Tumorentwicklung und einen Wachstumsvorteil der EBV-infizierten Zellen im weiteren Verlauf. So könnten die EBV-infizierten Zellen die nicht-infizierten Zellen im Laufe des Tumorwachstums nahezu verdrängt haben.

Chapel *et al.*⁶⁵ fanden in ihren Untersuchungen zwei Magenkarzinome, bei denen sich EBER-positive Tumorzellen nur in einem umschriebenen Areal

zeigten und insgesamt nur ca. 10% der Tumorzellen ausmachten. Die Autoren schließen methodische Probleme als Erklärung für dieses Phänomen aus und präferieren eine sekundäre Infektion eines ursprünglich EBV-negativen Tumors.

Ohne sich über die mögliche Genese dieses Phänomens zu äußern erwähnen auch zur Hausen *et al* ⁶⁶ partiell EBER-positive Magenkarzinome.

Für **Nasopharynx-Karzinome** ist eine unterschiedlich stark ausgeprägte Expression von EBER beschrieben. Yao *et al* ⁶⁷ untersuchten 27 EBV-assoziierte NPC auf die Expression von EBER. Sie fanden EBER in allen Tumorzellen, jedoch in unterschiedlicher Ausprägung, von gerade nachweisbar bis zu sehr ausgeprägt.

1.2.1. Erklärungsmodelle für partielle EBER-Positivität

Für das Phänomen der **partiellen EBER-Expression** sind folgende Erklärungsmodelle vorstellbar:

Modell 1: Die Tumoren sind bi- oder oligoklonal und bestehen aus EBV-positiven und EBV-negativen Zellklonen.

Modell 2: Ein Teil der Tumorzellen eliminieren oder verlieren ihr EBV-Genom.

Modell 3: Eine Fraktion des ursprünglich EBV-negativen Tumors wurde sekundär mit EBV infiziert.

Modell 4: Die viralen Gene, die für EBER-1 und EBER-2 kodieren, sind herunterreguliert oder stillgelegt. In diesem Falle wäre ein fehlender Nachweis von EBER auch bei EBV-Infektion dieser Zellen denkbar.

1.3. Fragestellung der Arbeit

Dieses Projekt beschäftigte sich mit der Untersuchung partiell EBER-positiver B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome und epithelialer Tumoren. Ziel dieser Arbeit war es zu klären, ob dem fehlenden Nachweis von EBER in einem Teil der Tumorzellen tatsächlich eine fehlende EBV-Infektion dieser Zellen zugrunde liegt (Modell 1, 2 oder 3) oder ob bei vorhandener EBV-Infektion die Expression von EBER in einigen Zellen eingestellt oder unter die Nachweisgrenze der ISH reduziert ist (Modell 4).

Um diese Frage zu beantworten, ist es notwendig, den Nachweis der EBER-Expression und des EBV-Genoms **in ein und der selben Zelle** durchführen zu können. Dies wird durch die Kombination der EBER-ISH mit einer hochsensitiven EBV-Einzelzell-PCR ermöglicht. So ist im ersten Schritt die Identifikation EBER-positiver und EBER-negativer Tumorzellen im Gewebeschnitt möglich und im zweiten Schritt können diese Zellen isoliert und mittels Einzelzell-PCR auf EBV-Genom untersucht werden.