

4. Diskussion

Das Vorkommen von EBER-positiven und EBER-negativen Tumorzellen in lymphatischen und epithelialen Tumoren wurde in der Vergangenheit in verschiedenen Studien dokumentiert^{30,64}. Außer dieser rein deskriptiven Feststellung gibt es aber keine Erklärung für dieses Phänomen. Die bisherigen Erklärungsversuche waren rein spekulativ und entbehrten jeder experimentellen Grundlage³¹.

Die vorliegende Arbeit sollte deswegen die Ursache dieses Phänomens durch experimentelle Daten einer Klärung näher bringen. Dazu untersuchten wir aus **vier partiell EBER-positiven B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen** insgesamt 174 Tumorzellen sowie aus **vier partiell EBER-positiven epithelialen Tumoren** insgesamt 121 Tumorzellen. Ziel war es herauszufinden, ob die EBER-positiven Tumorzellen in gleicher Art und Weise EBV-Genom enthalten wie die EBER-negativen Tumorzellen. Dazu wandten wir eine für diesen Zweck neuentwickelte hochsensitive EBV-Einzelzell-PCR auf diese isolierten EBER-positiven und EBER-negativen Tumorzellen an.

Die Ergebnisse waren erstaunlich: Für die B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome zeigte sich, dass in den EBER-negativen Tumorzellen keine EBV-spezifischen PCR-Amplifikate nachweisbar waren, wohingegen in EBER-positiven Tumorzellen diese Amplifikate nachgewiesen werden konnten. Anders bei den epithelialen Tumoren: Sowohl in den EBER-positiven als auch in den EBER-negativen Tumorzellen konnten EBV-spezifischen PCR-Amplifikate nachgewiesen werden.

4.1. Die partiell EBER-positiven B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome

4.1.1. Alle EBER-positiven Lymphomzellen sind EBV-infiziert

Von den isolierten 174 Lymphomzellen waren 88 EBER-positiv. In 38 dieser Zellen (43%) konnte durch Einzelzell-PCR EBV-Genom

nachgewiesen werden. Dieser EBV-Nachweis in knapp der Hälfte der untersuchten EBER-positiven Tumorzellen lässt auf eine tatsächliche EBV-Infektion aller EBER-positiver Tumorzellen schließen. Folgende Punkte unterstützen diesen Schluss:

1. Eine 100%ige Nachweisrate von EBV-DNA in formalinfixiertem Gewebe ist sehr unwahrscheinlich. Es wird angenommen, dass beim Fixierungsvorgang entstehende Strangbrüche in den DNA-Molekülen und die Quervernetzungen zwischen den Molekülen eine Amplifikation von großen Teilen der DNA unmöglich machen. Je länger der zu amplifizierende Bereich auf der DNA ist, um so größer ist die Wahrscheinlichkeit für Strangbrüche und Quervernetzungen auf diesem Abschnitt. Damit sinkt die Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Amplifikation dieses Genabschnitts und somit die Amplifikationsrate der Zellen. Diese Einschätzung wird auch von anderen Autoren geteilt⁶⁹. In eigenen Untersuchungen (s. Abschnitt 2.4.1.2) zeigten formalinfixierte Zellen der Zelllinie Namalwa (enthalten je zwei EBV-Genome) in 70% der Zellen ein positives Ergebnis in der EBV-Einzelzell-PCR.
2. Die in der vorliegenden Untersuchung isolierten Tumorzellen entstammen Gewebeschnitten. Beim Anfertigen von Gewebeschnitten kommt es zum Verlust von Zellmaterial. Teile der Zellen und damit des Genoms können in einer anderen Schnittebene und somit auf einem anderen Schnitt zu liegen kommen. Man kann also nicht von der Untersuchung ganzer Zellen ausgehen.
3. Einzelzell-PCR-Untersuchungen von EBV-infizierten RS-Zellen aus formalinfixierten Gewebeschnitten ergaben eine EBV-Genom-Nachweisrate von 41% der isolierten Zellen (s. Abschnitt 3.2.1).

Der Nachweis des EBV-Genoms in 43% der EBER-positiven Tumorzellen liegt also genau in dem Bereich, der für eine vollständig EBV-infizierte formalinfixierte Zellpopulation aus Gewebeschnitten zu erwarten wäre. Unter Berücksichtigung der o.g. Punkte 1.-3. schließen wir aus unseren

Ergebnissen, dass die **EBER-positiven Zellen der untersuchten B-NHL alle - wie erwartet - das EBV-Genom enthalten.**

4.1.2. Alle EBER-negativen Lymphomzellen sind frei von EBV

Wie stellen sich nun die Ergebnisse in der anderen Gruppe, den EBER-negativen Tumorzellen, dar? 85 der 86 Tumorzellen waren laut Einzelzell-PCR frei von EBV-Genom. Nur in einer EBER-negativen Tumorzelle zeigte sich ein positives PCR-Ergebnis (1,2%). Diese Zelle lag unmittelbar neben einer EBV-infizierten Zelle, so dass eine Kontamination durch diese Nachbarzelle bei der Manipulation an der Zelle wahrscheinlich ist (s. Abb. 3A). Daraus folgt, dass die **EBER-negativen Tumorzellen der untersuchten vier B-NHL kein EBV-Genom enthalten.**

4.1.3. Bedeutung dieser partiellen EBV-Infektion

Aus der Beobachtung, dass in den untersuchten partiell EBER-positiven B-Non-Hodgkin-Lymphomen alle EBER-positiven Tumorzellen EBV infiziert sind und alle EBER-negativen Tumorzellen frei von EBV sind, ergibt sich, dass tatsächlich **nur ein Teil der Tumorzellen EBV-infiziert ist.** Erklärungsmodelle, nach denen die partielle EBER-Positivität einiger Lymphome durch eine Herunterregulierung der EBER-Expression oder durch technische Limitation der Nachweismethode zustande kommt, sind hiermit widerlegt.

Von den eingangs genannten Erklärungsmodellen für die partielle EBER-Positivität bleiben also noch zwei übrig:

1. Ein Teil der Tumorzellen eines ursprünglich EBV-freien Tumors wurden im weiteren Verlauf der Tumorprogression mit EBV infiziert (**Sekundärinfektion mit EBV**).
2. Ein Teil der Tumorzellen eines ursprünglich in allen Zellen EBV-positiven Tumors hat das EBV-Genom im Laufe des Tumorwachstums verloren (**EBV-Verlust**).

Wie plausibel sind diese beiden Erklärungsmodelle?

4.1.3.1. Ad 1.: Sekundärinfektion mit EBV

Die Annahme, dass die Zellen eines EBV-negativen Tumors im Verlauf seines Wachstums nachträglich mit EBV infiziert werden könnte, beruht auf folgender Beobachtung: In vielen EBER-negativen Lymphomen findet man kleine EBER-positive Lymphozyten (sog. „bystander-Lymphozyten“) direkt zwischen den EBER-negativen Tumorzellen³⁰. Im Falle einer Reaktivierung dieser latenten EBV-Infektion der „bystander-Lymphozyten“ (in der Regel nur möglich bei supprimiertem Immunsystem des Wirts) könnten die Tumorzellen mit EBV infiziert werden. Eine solche sekundäre Infektion ist bislang für zahlreiche Zelllinien in vitro gezeigt worden. 70-72. In vivo hingegen ist dieses Phänomen bislang nur einmal bei einem Patienten mit Immundefizit beschrieben worden: In einer Untersuchung aus dem Jahr 1993⁷³ wird eine mögliche EBV-Sekundärinfektion von Tumorzellen eines Patienten mit Aids und einer EBV-positiven akuten lymphoblastischen Leukämie vom Burkitt-Typ untersucht. Die Untersucher fanden zwei verschiedene EBV-Klone in ansonsten monoklonalen Zellkulturen dieses Lymphoms. Sie schließen daraus, dass hier zu verschiedenen Zeitpunkten Infektionen mit EBV stattgefunden haben müssen. Weiter Hinweise für eine sekundäre Infektion von Tumorzellen mit EBV, besonders für immunkompetente Patienten, existieren nicht. Nähme man eine Sekundärinfektion in unseren untersuchten Fällen trotzdem an, so müsste diese sehr früh in der Entwicklung des Tumors stattfinden. Eine parallele sekundäre Infektion vieler Tumorzellen bei einem größeren Tumor, die zu EBV-Infektionsraten bis zu 80% der Zellen führt, ist praktisch ausgeschlossen.

4.1.3.1.1. Bedeutung des möglichen Vorliegens einer Sekundärinfektion mit EBV für die Rolle des EBV bei der Tumorgenese

Hätte die Infektion mit EBV erst in einem fortgeschrittenen Stadium des Tumorwachstums stattgefunden, hätte EBV nur eine untergeordnete Rolle bei der Genese dieser B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome. Die maligne

Transformation hätte unabhängig vor der EBV-Infektion stattgefunden. Die Infektion wäre lediglich ein zusätzliches Ereignis in der Tumorprogression mit bislang ungeklärten Auswirkungen.

4.1.3.2. Ad 2.: EBV-Verlust

Die Möglichkeit, dass ursprünglich EBV-infizierte Zellen das virale Genom verlieren, ist *in vitro* gezeigt und auch in einem Falle *in vivo* beobachtet worden.

Shimizo *et al.*⁷⁴ beschrieben den Verlust von EBV in der BL-Zelllinie Akata. Waren hier bei Beginn der Kultivierung noch alle Zellen der Population EBV-positiv, so waren nach zwei Jahren nur noch die Hälfte der Zellen EBV infiziert. Vergleichbares ist auch für Epithelzelllinien aus Nasopharynx-Karzinomen beschrieben worden⁷⁵.

Die Vermutung eines Verlustes von EBV-Episom aus Tumorzellen wird durch eine Beobachtung unserer eigenen Arbeitsgruppe gestärkt: 1997 beschrieben Delecluse *et al.*⁷⁶ folgenden Fall: Bei einem fünfjährigen Jungen wurde die Diagnose eines M. Hodgkin gestellt. Die erste Biopsie zeigte einen M. Hodgkin von nodulär-sklerosierendem Typ in linken zervikalen und supraklavikulären Lymphknoten sowie im Mediastinum. Die Reed-Sternberg-Zellen waren EBV-infiziert. Der Junge erhielt eine Polychemotherapie und eine Bestrahlung. Nach sechs Monaten war eine komplette Remission eingetreten. Ein Jahr später zeigten sich erneut vergrößerte zervikale Lymphknoten, diesmal rechtsseitig und im Mediastinum. Die zweite Biopsie ergab ein dem Ersttumor identisches histologisches Bild. Der Immunphänotyp der Tumorzellen war ebenfalls identisch. Einziger Unterschied: Die Reed-Sternberg-Zellen waren EBER-negativ. Ein Vergleich der Immunglobulinsequenzen der beiden Tumoren, der die Gleichheit dieser beiden Tumoren beweisen würde, konnte allerdings mangels amplifizierbarer DNA nicht durchgeführt werden. Anhand der beschriebenen gleichen Lokalisation und den identischen histologischen und immunologischen Eigenschaften geht die Arbeitsgruppe jedoch davon aus, dass der zweite Tumor ein Rezidiv des ersten war und

nicht ein unabhängig vom ersten Tumor aufgetretener Tumor. Aus dieser Annahme folgt zwingend, dass die Tumorzellen das Epstein-Barr-Virus verloren haben.

4.1.3.2.1. Wie kann es zu einem Verlust von EBV aus den Tumorzellen kommen?

Schimizo *et al*⁷⁴ spekulieren in ihrer Arbeit über eine mögliche Rolle des latenten EBV-Genproduktes EBNA-1 bei diesem Verlust von DNA. Wie bereits in Kapitel 2.1.3 erwähnt, spielt EBNA-1 eine wichtige Rolle bei der Replikation und der Verteilung der EBV-Episome auf die Tochterzellen bei der Zellteilung. Eine Interaktion von EBNA-1 mit zellulären Proteinen könnte zu dessen Inaktivierung führen und somit zu einer gestörten Plasmid-Replikation oder –Verteilung.

Auch die Herunterregulierung von EBNA-1 könnte bei der Zellteilung zu Störungen der EBV-Episom-Verteilung in den Tochterzellen führen. Eine solche EBNA-1-Verminderung ist von Takada *et al.*⁷⁷ beschrieben worden: Sie transfizierten Zellen der EBV-positiven BL-Zelllinie Raji mit dem EBV-Gen BZLF1 und beobachteten folgend eine verminderte Expression von EBNA-1 und 2. Mit der Verminderung von EBNA in den Zellen ging eine Reduktion der EBV-Episome in den Zellen einher. Auch Glaser *et al*⁷⁵ beschrieben eine Verminderung von EBNA in Zellen einer Zellkultur von EBV- und EBNA-positiven epithelialen Tumorzellen (ob hier EBNA-1 oder EBNA-2 untersucht wurde, ist nicht angegeben). Während der kontinuierlichen Zellpassage verloren immer mehr Tochterzellen EBNA und EBV.

Eine solche Verminderung von besonders EBNA-1 Protein könnte auch im Zuge des Tumorwachstums zum Verlust von EBV-DNA aus einem Teil der Tumorzellen führen.

4.1.3.2.2. Bedeutung eines möglichen Verlustes von EBV aus den Tumorzellen für die Rolle des EBV bei der Tumorgenese

Wenn die Annahme richtig ist, dass die maligne transformierte Vorläuferzelle des Tumors EBV-infiziert war, dann kann nicht ausgeschlossen werden, dass EBV in der frühen Phase der Tumorentwicklung eine Rolle in der Zellenentartung gespielt hat. In der weiteren Tumorentwicklung könnten dann zusätzliche genetische Defekte aufgetreten sein, die die Bedeutung von EBV für das Überleben der Zellen reduzieren. Ein Verlust von EBV-Genom bei der Zellteilung wäre also zu diesem Zeitpunkt für das Fortbestehen des Tumors von verminderter Wichtigkeit; die Tumorzellen würden auch ohne das Vorhandensein von EBV-Genom überleben. Dies könnte das Bild der partiell EBER-Positivität der Tumorzellen erklären.

4.2. Die partiell EBER-positiven epithelialen Tumoren

In der Gruppe der epithelialen Tumoren existieren wie bei den Lymphomen partiell EBER-positiven Karzinome. Auch in diesen Fällen stellt sich die Frage: Handelt es sich bei der partiellen EBER-Positivität tatsächlich um eine partielle EBV-Infektion der Tumorzellpopulation oder sind alle Tumorzellen EBV-infiziert und EBER lässt sich aus unbekanntem Gründen nicht nachweisen?

Um diese Frage zu klären, untersuchten wir vier epitheliale Tumoren: Drei partiell EBER-positive Magenkarzinome und ein partiell EBER-positives Nasopharynx-Karzinom. Insgesamt isolierten wir 121 Tumorzellen, davon 46 EBER-positiv und 75 EBER-negativ. In der EBV-Einzelzell-PCR dieser Tumorzellen zeigte sich im Vergleich zu den lymphatischen Tumoren ein anderes und unerwartetes Bild: In 34 der EBER-negativen Tumorzellen (45,3%) ließ sich EBV-DNA nachweisen. Von den EBER-positiven Karzinomzellen konnte EBV sogar in 87% (40 von 46) der Zellen nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse werfen zahlreiche Fragen auf:

1. Wie kann man sich den Nachweis von EBV-DNA in EBER-negativen Zellen erklären?

2. Warum ist die Nachweisrate von EBV in den EBER-positiven Zellen höher als in den EBER-negativen Zellen?
3. Warum konnten in einem größeren Anteil der EBER-positiven Karzinomzellen EBV nachgewiesen werden als in den EBER-positiven Lymphomzellen?

4.2.1. EBER-negative Karzinomzellen enthalten EBV

In 45% der EBER-negativen Karzinomzellen konnte EBV nachgewiesen werden. Diese Daten lassen nur eine Schlussfolgerung zu: Die untersuchten Karzinomzellen sind EBV-infiziert, ohne nachweisbares EBER zu exprimieren.

Dass es sich bei diesen Daten um keine Artefakte handelt, wurde von uns ausgiebig überprüft. Zum einen durch Entnahme von Pufferproben nach jeder Tumorzelle, wie auch bei den Lymphomen beschrieben. In keiner dieser Pufferproben konnte EBV nachgewiesen werden, somit wurde eine falsche Positivität verursacht durch EBV-DNA im Überschichtungspuffer ausgeschlossen. Um eine Kontamination der entnommenen Zellen durch EBV-Genom aus benachbarten Zellen auszuschließen, untersuchten wir zusätzlich 48 EBER-negative Lymphozyten, die sich in der Nachbarschaft zu EBV-infizierten Zellen befanden (vgl. Abb. 8C). In zwei dieser Zellen konnten wir EBV-DNA nachweisen (4,2%). Dieses Ergebnis bedeutet, dass eine Kontamination durch Nachbarzellen vorkommen kann, jedoch sehr selten ist.

In Abschnitt 4.1.1. wiesen wir darauf hin, dass positive EBV-PCR-Ergebnisse in 40-50% der Zellen für eine EBV-Infektion aller Zellen spricht. Auf die untersuchten Karzinomzellen übertragen bedeutet dies:

Alle EBER-negativen Tumorzellen enthalten das EBV-Genom.

Dieses Phänomen ist in der Literatur bislang nicht beschrieben worden. Hier zeigt sich zum ersten Mal, dass die gängige EBER-ISH offensichtlich nicht den tatsächlichen EBV-Infektionsstatus in Magenkarzinomen und Nasopharynx-Karzinomen widerspiegelt.

Da in den EBER-negativen Tumorzellen mittels EBER-ISH kein EBER nachgewiesen werden konnte, muss die Expression von EBER in diesen Zellen auf ein Maß unterhalb der Nachweisgrenze reduziert oder komplett abgeschaltet sein. Wie es zu dieser Abschaltung des EBER-Gens kommt, kann hier nicht geklärt werden. Bekannt ist bislang, dass es im Rahmen einer Aktivierung einer latenten zur lytischen EBV-Infektion zu einer verminderten EBER-Expression kommt⁷⁸. Allerdings gibt es in den hier untersuchten Fällen keine Anzeichen für eine Aktivierung der Infektion. Außerdem wäre in diesem Fall in den EBER-negativen Zellen eher eine größere Menge an EBV-Genom zu erwarten und nicht eine geringere.

4.2.2. EBER-positive Karzinomzellen enthalten mehr Kopien des EBV-Genoms als EBER-negative Karzinomzellen

In den EBER-positiven Karzinomzellen ließ sich EBV häufiger nachweisen als in den EBER-negativen Karzinomzellen (87% vs. 45%). Dieser Unterschied ließ sich in allen vier untersuchten Fällen nachweisen. Dieses Ergebnis ist nur damit zu erklären, dass sich in den EBER-positiven Karzinomzellen mehr Kopien des EBV-Genoms befinden als in den EBER-negativen Zellen.

Hinweise für eine mögliche Verminderung der Anzahl von EBV-Episomen aus Karzinomzellen liefern Glaser *et al.*⁷⁵. Sie untersuchten zwei Zellkulturen aus NPC auf das Vorhandensein von EBV-DNA und EBNA (ob hier EBNA-1 oder EBNA-2 untersucht wurde, ist nicht angegeben). In der Zelllinie HNE-1 fanden sich zu Beginn der Kultivierung ca. 10% EBNA-positive Zellen. Sie beobachteten eine kontinuierliche Abnahme der EBNA-positiven Zellen. EBV-DNA konnte durch Southern blot bis zur 35. Passage nachgewiesen werden, danach nicht mehr. In dieser Untersuchung konnte nicht abschließend geklärt werden, ob es zu einem Verlust von EBV-DNA aus den Zellen gekommen war oder ob die EBNA-positiven Zellen den EBNA-negativen Zellen gegenüber einen Wachstumsnachteil hatten und so aus der Zellkultur verschwanden.

4.2.3. Karzinomzellen enthalten mehr EBV-Episome als Lymphomzellen

Wir konnten in einer größeren Anzahl von EBER-positiven Karzinomzellen EBV nachweisen als in den EBER-positiven Lymphom-Zellen. Dieses Phänomen ist am ehesten durch die Hypothese erklärbar, dass die untersuchten Karzinomzellen mehr EBV-Episome enthalten als die untersuchten Lymphomzellen.