

3. Ergebnisse

3.1. EBER-ISH

3.1.1. Lymphome

Fall 1:

Extramedulläres Plasmozytom

Ca. 30-50% der Tumorzellen waren EBER-positiv. In einem dichten Tumorzellrasen lagen EBER-positive Zellen dicht neben EBER-negativen Zellen (s. Abb. 1A und 1B).

Fall 2:

Diffuses großzelliges immunoblastisches B-Zell-Lymphom

In dem dichten Tumorzellrasen fanden sich Inseln mit zahlreichen (bis zu 80%) EBER-positiven Zellen. In diesen Inseln lagen EBER-positive Zellen dicht neben EBER-negativen Zellen. Die Tumorzellen zwischen diesen Inseln waren gleichmäßig EBER-negativ (s. Abb. 2A).

Fall 3:

Diffuses großzelliges zentroblastisches Lymphom

50-70% der Tumorzellen exprimierten EBER. Positive und negative Zellen lagen dicht beieinander (s. Abb. 3A und 3B).

Fall 4:

Diffuses großzelliges anaplastisches Lymphom

80% der Tumorzellen exprimierten EBER. Dazwischen lagen wenige EBER-negative Tumorzellen (s. Abb. 4A).

3.1.2. Karzinome

Fall 5-7:

Magenkarzinome

Es fanden sich Areale mit durchgängig EBER-exprimierenden Tumorzellen sowie EBER-freie Areale und eingestreute EBER-negative Tumorzellen in ansonsten EBER-positiven Drüsen (s. Abb. 5A, 5B und 5C, 6A und 6B, 7A, 7B und 7C)

Fall 8:

Nasopharynxkarzinom vom Typ Schmincke

Ca. 50% der Tumorzellen exprimierten EBER. EBER-positive und EBER-negative Zellen sind über den gesamten Tumor verteilt (s. Abb. 8A, 8B und 8C).

3.2. EBV-Einzelzell-PCR

3.2.1. Etablierung der EBV-Einzelzell-PCR

Die in dieser Arbeit eingesetzte Einzelzell-PCR für EBV wurde an Zellen der BL-Zelllinie Namalwa etabliert und optimiert. Zellen dieser Zelllinie verfügen über nur zwei Genome EBV pro Zelle und bieten sich daher für die Etablierung einer hochempfindlichen Methode an. An einzelnen formalinfixierten Namalwa-Zellen (Cytospin) wurde eine EBV-PCR durchgeführt. Bei 70% der Zellen zeigte sich ein positives Signal. Das negative Ergebnis in den verbleibenden 30% der Zellen kann durch einen fixierungsbedingten Verlust der Amplifizierbarkeit erklärt werden.

Zur weiteren Testung wurde diese Methode an RS-Zellen eines M. Hodgkin getestet. Am formalinfixierten, geschnittenen Material war zuvor gezeigt worden, dass alle HRS-Zellen LMP-positiv, also EBV-infiziert waren. Die RS-Zellen wurden auf die beschriebene Weise isoliert und einer EBV-Einzelzell-PCR unterzogen. 41% dieser Zellen zeigten sich EBV-positiv in der Einzelzell-PCR. Die im Vergleich zu den Namalwa-Zellen niedrigere Rate an positiven Ergebnissen kann durch einen zusätzlichen Verlust von

amplifizierbarem Material durch den Schneideprozess und durch möglicherweise längere Einwirkzeit von Formalin bei der Fixierung.

3.2.2. Ergebnisse der EBV-Einzelzell-PCR an Lymphomen

Nach wiederholter Prüfung der reproduzierbaren Sensitivität der EBV-Einzelzell-PCR wurden vier partiell EBER-positive NHL untersucht. Insgesamt wurden 88 EBER-positive und 86 EBER-negative Tumorzellen sowie 166 Pufferproben untersucht. Pro Fall waren dies zwischen acht und 30 EBER-positive Tumorzellen, zwischen acht und 34 EBER-negative Tumorzellen und zwischen 17 und 63 Pufferproben.

Die Tendenz war eindeutig (s. Tabelle 5 und Diagramm 1): 43% aller EBER-positiven Tumorzellen waren auch in der EBV-Einzelzell-PCR positiv. Im Einzelnen betrug die Rate der EBV-PCR-positiven Zellen in Fall 2 23%, in Fall 4 46,4%, in Fall 3 59% und in Fall 1 62,5% (s. dazu beispielhaft die Abbildungen der PCR-Ergebnisse 1C und 1D, 2C, 3B und 3C und 4B). Im Gegensatz dazu fand sich nur im Fall 3 eine EBER-negative, aber EBV-PCR-positiv Tumorzelle (s. Abb. 3A und 3B). Diese entspricht 1,2% aller EBER-negativen Tumorzellen. Von den 166 Negativkontrollen (Pufferproben) war ebenfalls nur eine einzige EBV-PCR-positiv (0,6%). Dieses Ergebnis zeigt, dass EBER-negative Tumorzellen keine EBV-DNA enthalten und dass – wie auch zu erwarten war – ein großer Teil der EBER-positiven Zellen auch eine Darstellung der EBV-DNA zuließ.

Tabelle 5: Einzelzell-PCR-Analyse EBER-positiver und EBER-negativer Lymphomzellen auf das Vorhandensein von Epstein-Barr-Virus-Genom

| Fall/Diagnose | EBER-positive Tumor-Zellen | | EBER-negative Tumorzellen | | Puffer-Kontrollen |
|---|------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|---------------------|
| | Anzahl der isolierten Zellen | Anzahl EBV-PCR-positiver Zellen (%) | Anzahl der isolierten Zellen | Anzahl EBV-PCR-positiver Zellen (%) | EBV PCR positiv (%) |
| 1. Extramedulläres Plasmozytom | 8 | 5/8 (62,5%) | 8 | 0/8 (0%) | 0/17 (0%) |
| 2. Diffuses großzelliges B-NHL, immunoblastischer Typ | 30 | 7/30 (23%) | 34 | 0/34 (0%) | 0/63 (0%) |
| 3. Diffuses großzelliges B-NHL, zentroblastischer Typ | 22 | 13/22 (59%) | 17 | 1/17 (6%) | 0/42 (0%) |
| 4. Diffuses großzelliges B-NHL, anaplastischer Typ | 28 | 13/28 (46,4%) | 27 | 0/27 (0%) | 1/44 (2%) |
| Gesamt | 88 | 38/88 (43%) | 86 | 1/86 (1,2%) | 1/166 (0,6%) |

Diagramm 1: Einzelzell-PCR-Analyse EBER-positiver und EBER-negativer Lymphomzellen auf das Vorhandensein von Epstein-Barr-Virus-Genom

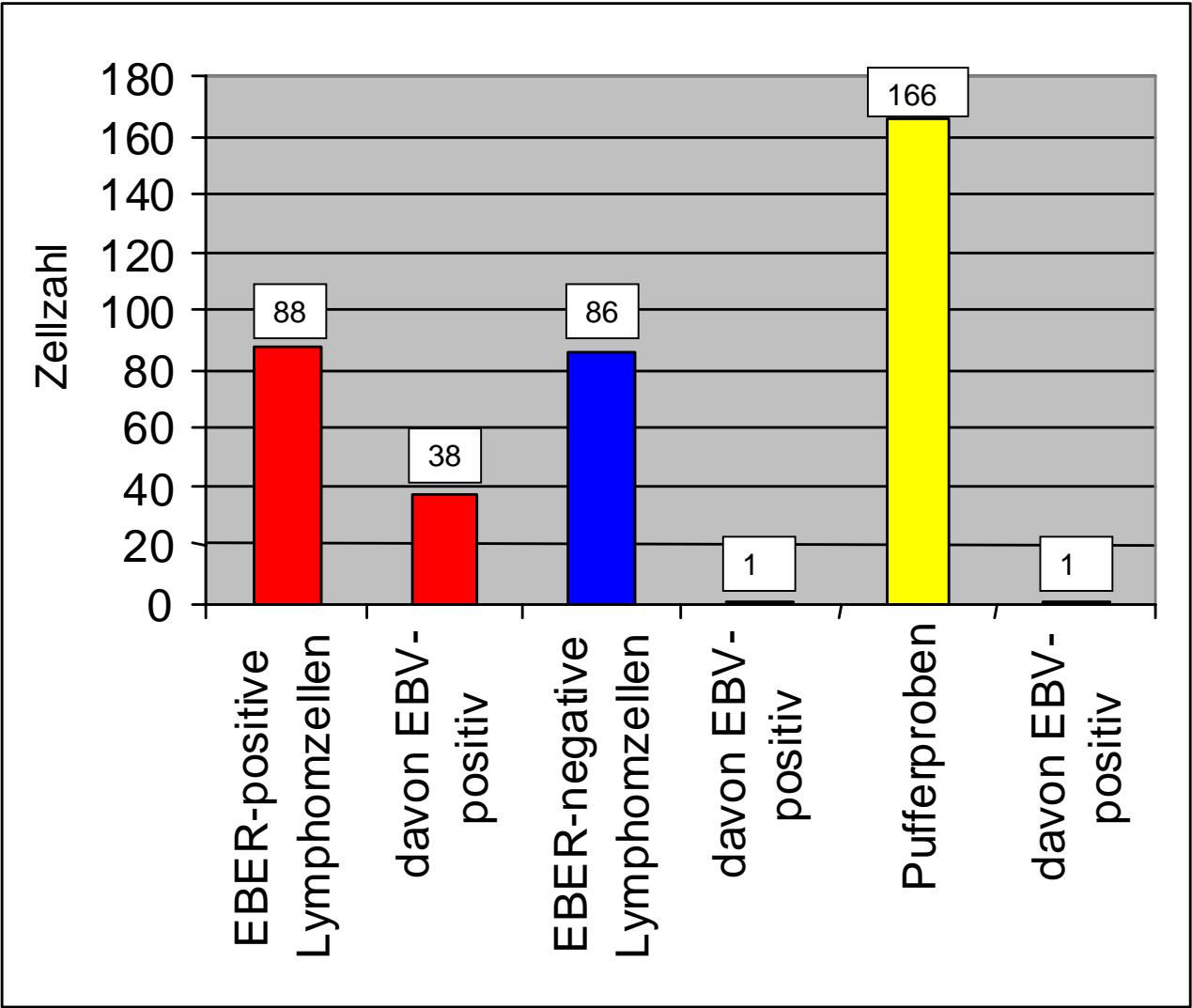
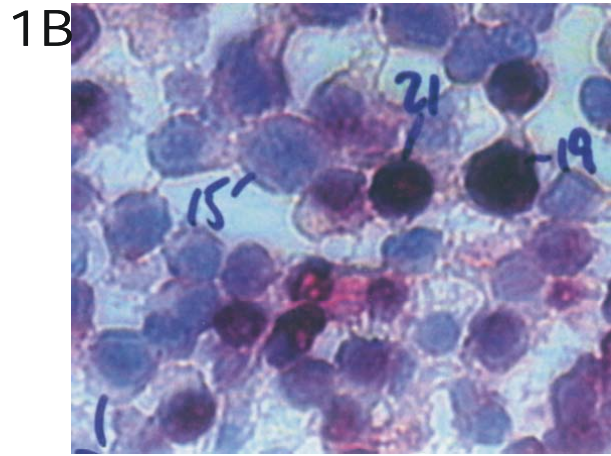
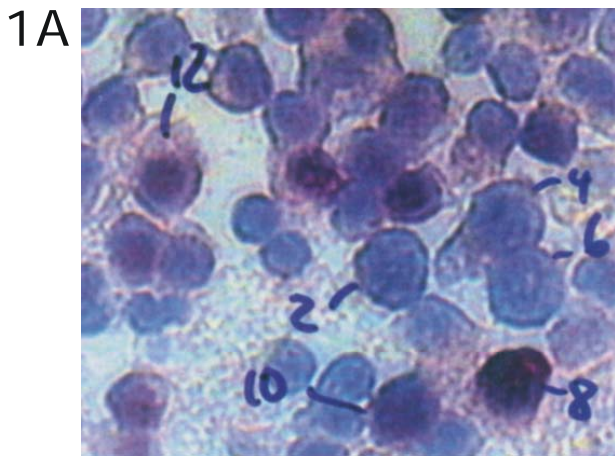
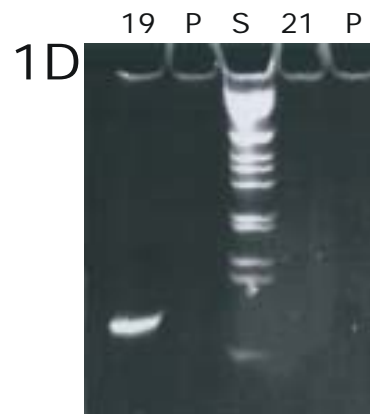
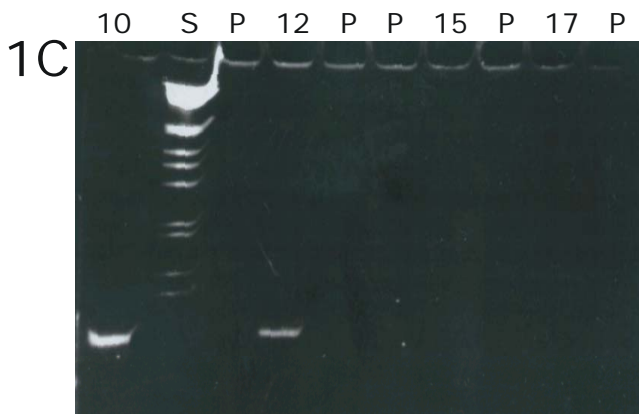


Abb. 1: Extramedulläres Plasmozytom (Fall 1)



17



1A und 1B: EBER-ISH; Tumorzellen vor Isolierung.

1C und 1D: Korrespondierende Ergebnisse der EBV-DNA PCR der isolierten Zellen.

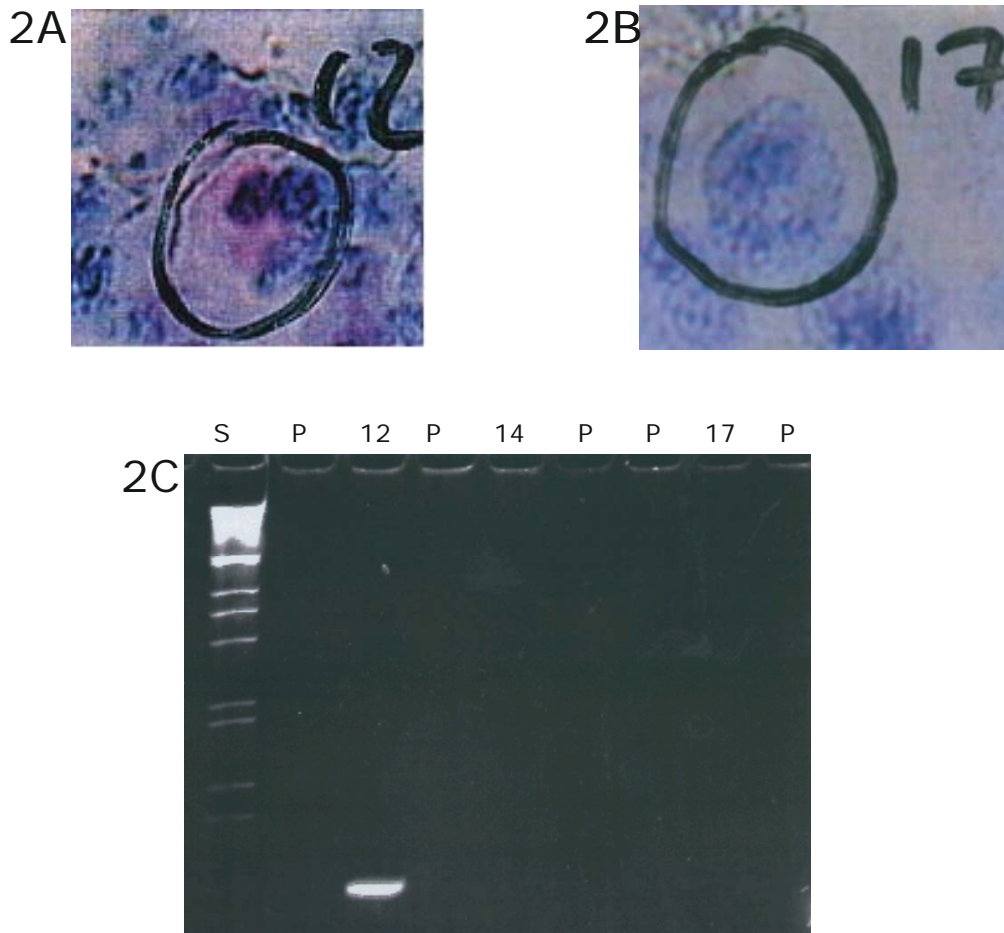
Die Nummerierung der Spuren entspricht der Nummerierung der Zellen (S=Standart, P=Pufferprobe).

Tumorzellen 10, 12 und 19: EBER-positiv mit positivem EBV-DNA Nachweis in der EBV-Einzelzell-PCR.

Tumorzelle 21: EBER-positiv mit negativem EBV-DNA Nachweis in der EBV-Einzelzell-PCR.

Tumorzellen 15 und 17: EBER-negativ mit negativem EBV-DNA Nachweis in der EBV-Einzelzell-PCR.

Abb. 2: Diffuses großzelliges immunoblastisches B-Zell-Lymphom (Fall 2)



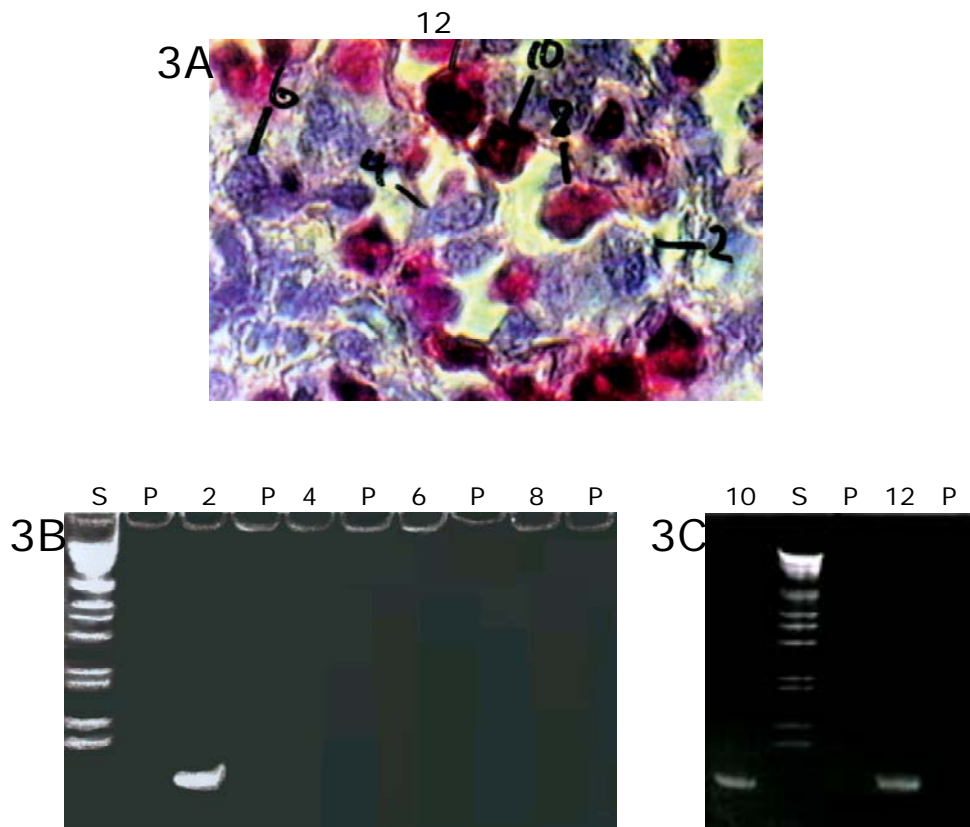
2A und 2B: EBER-ISH; Tumorzellen vor Isolierung.

2C: Korrespondierende Ergebnisse der EBV-DNA PCR der isolierten Zellen. Die Nummerierung der Spuren entspricht der Nummerierung der Zellen (S=Standard, P=Pufferprobe). Spur 14: Zelle nicht dargestellt.

Tumorzelle 12: EBER-positiv mit positivem EBV-DNA Nachweis in der EBV-Einzelzell-PCR.

Tumorzelle 17: EBER-negativ mit negativem EBV-DNA Nachweis in der EBV-Einzelzell-PCR.

Abb. 3: Diffuses großzelliges zentroblastisches Lymphom (Fall 3)



3A: EBER-ISH; Tumorzellen vor Isolierung.

3B und 3C: Korrespondierende Ergebnisse der EBV-DNA PCR der isolierten Zellen.

Die Nummerierung der Suren entspricht der Nummerierung der Zellen (S=Standart, P=Pufferprobe).

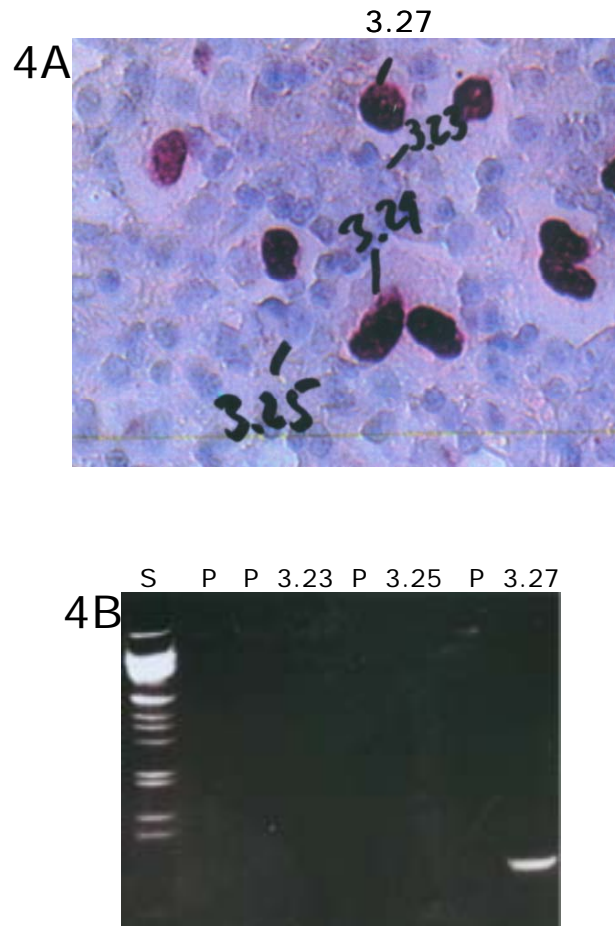
Tumorzellen 10 und 12: EBER-positiv mit positivem EBV-DNA Nachweis in der EBV-Einzelzell-PCR.

Tumorzelle 8: EBER-positiv mit negativem EBV-DNA Nachweis in der EBV-Einzelzell-PCR.

Tumorzelle 2: Einzige isolierte EBER-negative Tumorzelle mit positivem EBV-DNA Nachweis in der EBV-Einzelzell-PCR.

Tumorzellen 4 und 6: EBER-negativ mit negativem EBV-DNA Nachweis in der EBV-Einzelzell-PCR.

Abb. 4: Diffuses großzelliges anaplastisches Lymphom (Fall 4)



4A: EBER-ISH; Tumorzellen vor Isolierung.

4B: Korrespondierende Ergebnisse der EBV-DNA PCR der isolierten Zellen. Die Nummerierung der Spuren entspricht der Nummerierung der Zellen (S=Standart, P=Pufferprobe).

Tumorzelle 3.27: EBER-positiv mit positivem EBV-DNA Nachweis in der EBV-Einzelzell-PCR.

Tumorzellen 3.23 und 3.25: EBER-negativ mit negativem EBV-DNA Nachweis in der EBV-Einzelzell-PCR.

3.2.3. Ergebnisse der EBV-Einzelzell-PCR an epithelialen Tumoren

In die Untersuchung wurden drei partiell EBER-positive Magen-Karzinome und ein partiell EBER-positives Nasopharynx-Karzinom eingeschlossen.

Insgesamt wurden 46 EBER-positive und 75 EBER-negative Tumorzellen untersucht sowie 48 EBER-negative Lymphozyten und 122 Pufferproben. Dies waren pro Fall 9-14 EBER-positive Tumorzellen, 13-28 EBER-negative Tumorzellen, 5-22 EBER-negative Bystander-Lymphozyten und 13-41 Pufferproben.

Wir fanden die folgenden Ergebnisse (s. Tabelle 6 und Diagramm 2): 66,7 bis 100% der EBER-positiven Zellen waren auch in der EBV-Einzelzell-PCR EBV-positiv (Durchschnitt 87%).

Bezüglich der EBER-negativen Tumorzellen zeigte sich bei den epithelialen Tumoren ein völlig anderes Bild als bei den lymphatischen Tumoren: Hier zeigten sich insgesamt 45,3% der EBER-negativen Karzinomzellen EBV-PCR-positiv. Dabei fanden sich Raten von EBER-negativen, aber EBV-PCR-positiven Zellen zwischen 17,8% in Fall 5 und 85% in Fall 7 (s. zu den PCR-Ergebnissen auch beispielhaft die Abb. 5D, 6C, 7F, 7G und 7H sowie 8D und E).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden neben den Pufferproben zusätzliche Negativkontrollen durchgeführt. EBER-negative Lymphozyten in unterschiedlichen Abständen zu den EBER-positiven Tumorzellen wurden ebenfalls isoliert und amplifiziert. Dabei zeigten nur zwei der insgesamt 48 Lymphozytenproben ein positives Amplifikat in der EBV-Einzelzell-PCR (s. Abb. 7E und 7F). Diese beiden Proben lagen direkt neben EBER-positiven Tumorzellen. Keine der Pufferproben war EBV-positiv.

Tabelle 6: Einzelzell-PCR-Analyse EBER-positiver und EBER-negativer Tumorzellen epithelialer Tumoren auf das Vorhandensein von Epstein-Barr-Virus-Genom

| Fall | EBER-positive Tumorzellen | | EBER-negative Tumorzellen | | EBER-negative Lymphozyten | Pufferkontrollen |
|------------------------|------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|---------------------|
| | Anzahl der isolierten Zellen | Anzahl EBV-PCR-positiver Zellen (%) | Anzahl der isolierten Zellen | Anzahl EBV-PCR-positiver Zellen (%) | EBV-PCR-positiv (%) | EBV-PCR-positiv (%) |
| 5. Magenkarzinom | 9 | 9/9 (100%) | 28 | 5/28 (17,8%) | 0/14 (0%) | 0/33 (0%) |
| 6. Magenkarzinom | 9 | 6/9 (66,7%) | 13 | 3/13 (23%) | 0/7 (0%) | 0/13 (0%) |
| 7. Magenkarzinom | 14 | 14/14 (100%) | 20 | 17/20 (85%) | 2/22 (9%) | 0/41 (0%) |
| 8. Nasopharynxkarzinom | 14 | 11/14 (79%) | 14 | 9/14 (64%) | 0/5 (0%) | 0/35 (0%) |
| Gesamt | 46 | 40/46 (87%) | 75 | 34/75 (45,3%) | 2/48 (4,2%) | 0/122 (0%) |

Diagramm 2: Einzelzell-PCR-Analyse EBER-positiver und EBER-negativer Tumorzellen epithelialer Tumoren auf das Vorhandensein von Epstein-Barr-Virus-Genom

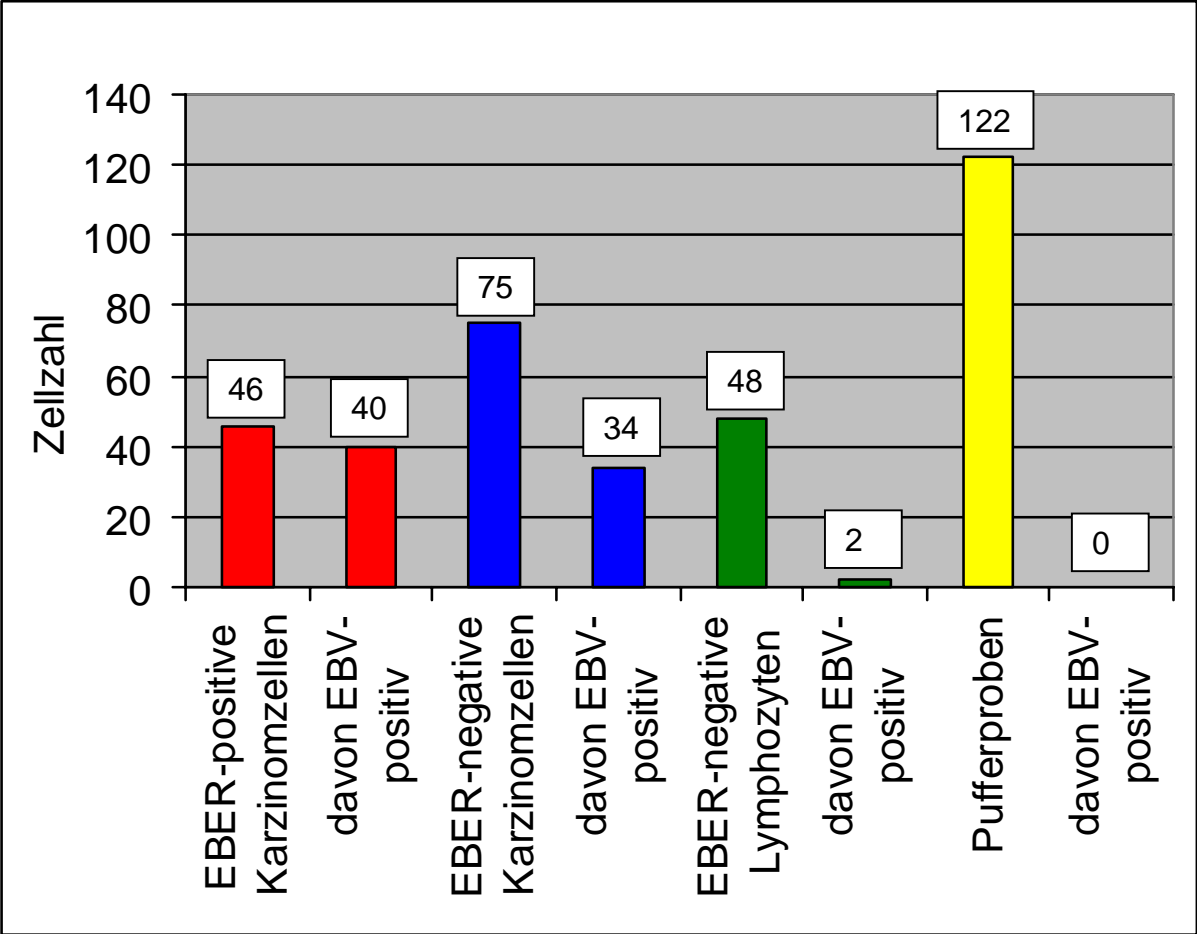
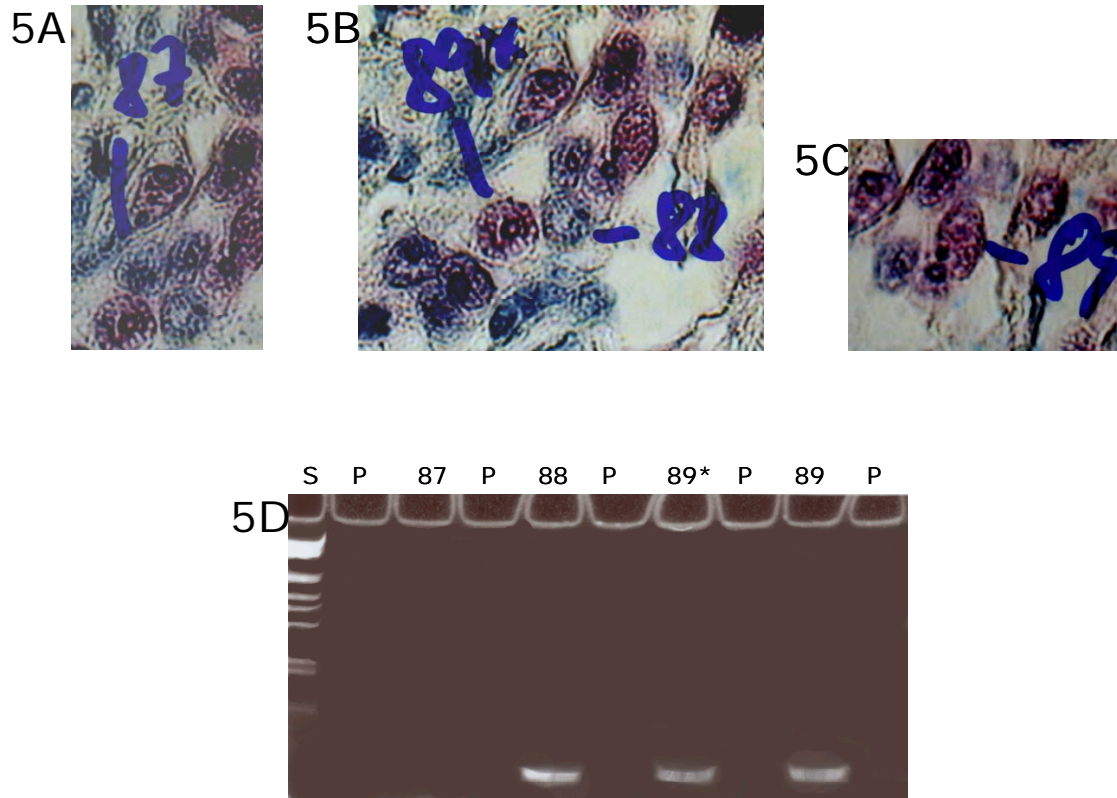


Abb. 5: Magenkarzinom (Fall 5)



5A, 5B und 5C: EBER-ISH; Tumorzellen vor Isolierung.

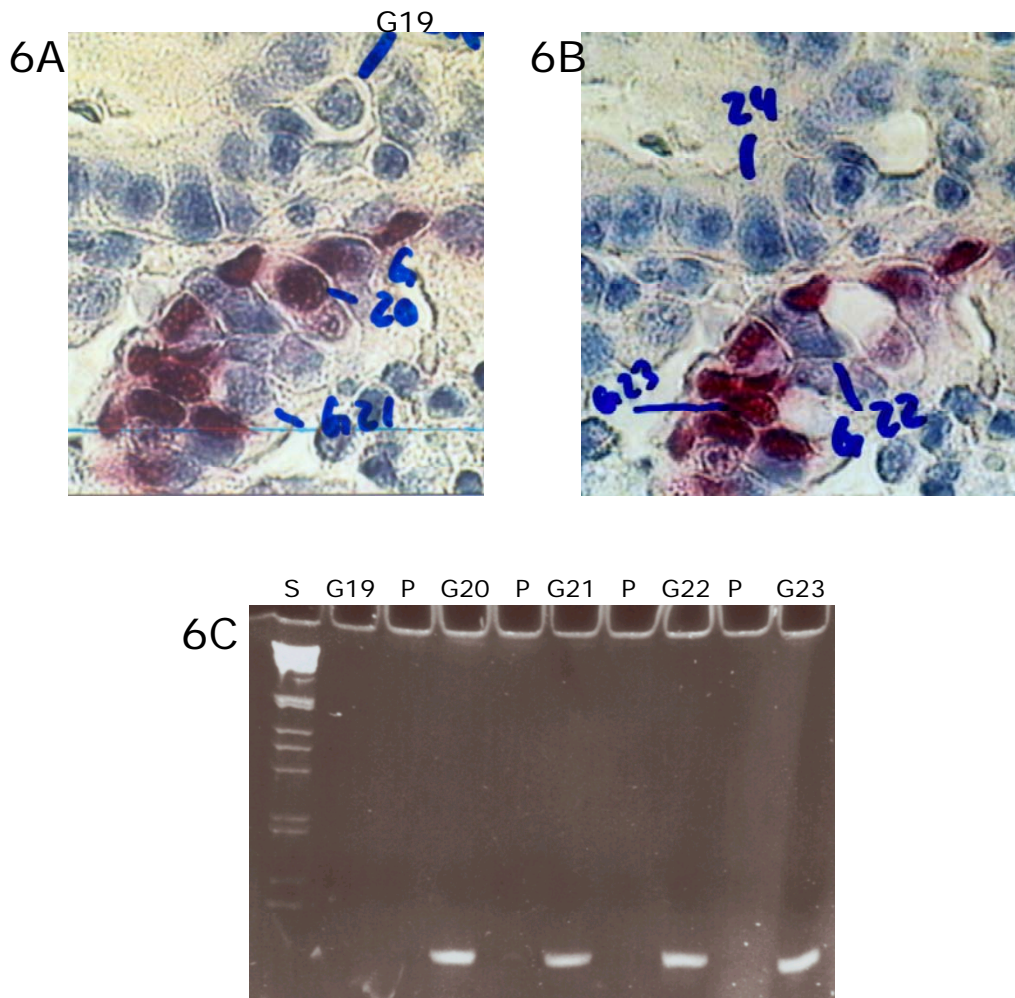
5D: Korrespondierende Ergebnisse der EBV-DNA PCR der isolierten Zellen. Die Nummerierung der Spuren entspricht der Nummerierung der Zellen (S=Standard, P=Pufferprobe).

Tumorzellen 89* und 89: EBER-positiv mit positivem EBV-DNA Nachweis in der EBV-Einzelzell-PCR.

Tumorzelle 88: EBER-negativ mit positivem EBV-DNA Nachweis in der EBV-Einzelzell-PCR.

Tumorzellen 87: EBER-negativ mit negativem EBV-DNA Nachweis in der EBV-Einzelzell-PCR.

Abb. 6: Magenkarzinom (Fall 6)



6A und 6B: EBER-ISH; Tumorzellen vor Isolierung.

6C: Korrespondierende Ergebnisse der EBV-DNA PCR der isolierten Zellen. Die Nummerierung der Spuren entspricht der Nummerierung der Zellen (S=Standard, P=Pufferprobe).

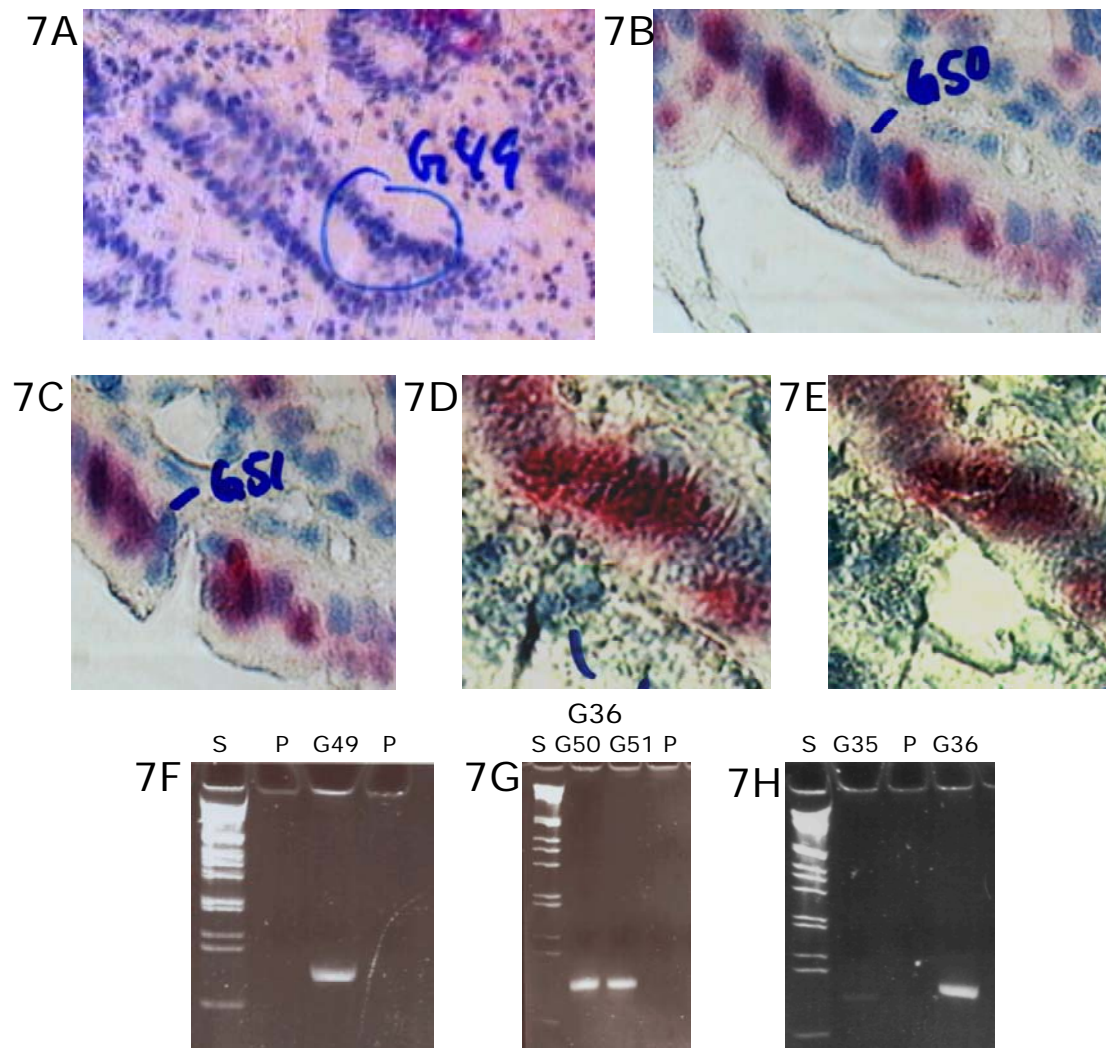
Tumorzelle G20 und G23: EBER-positiv mit positivem EBV-DNA Nachweis in der EBV-Einzelzell-PCR.

Tumorzellen G21 und G22: EBER-negativ mit positiver EBV-DNA Nachweis in der EBV-Einzelzell-PCR.

Tumorzelle G19: EBER-negativ mit negativem EBV-DNA Nachweis in der EBV-Einzelzell-PCR.

Beachte: Durch die Mikromanipulation der Zellen G20, G21 und G19 wurden die Nachbarzellen nicht verletzt.

Abb. 7: Magenkarzinom (Fall 7)



7A, 7B, 7C, 7D und 7E: EBER-ISH; Tumorzellen vor/bzw. nach Isolierung.
7F, 7G und 7H: Korrespondierende Ergebnisse der EBV-DNA PCR der isolierten Zellen. Die Nummerierung der Spuren entspricht der Nummerierung der Zellen (S=Standart, P=Pufferprobe).

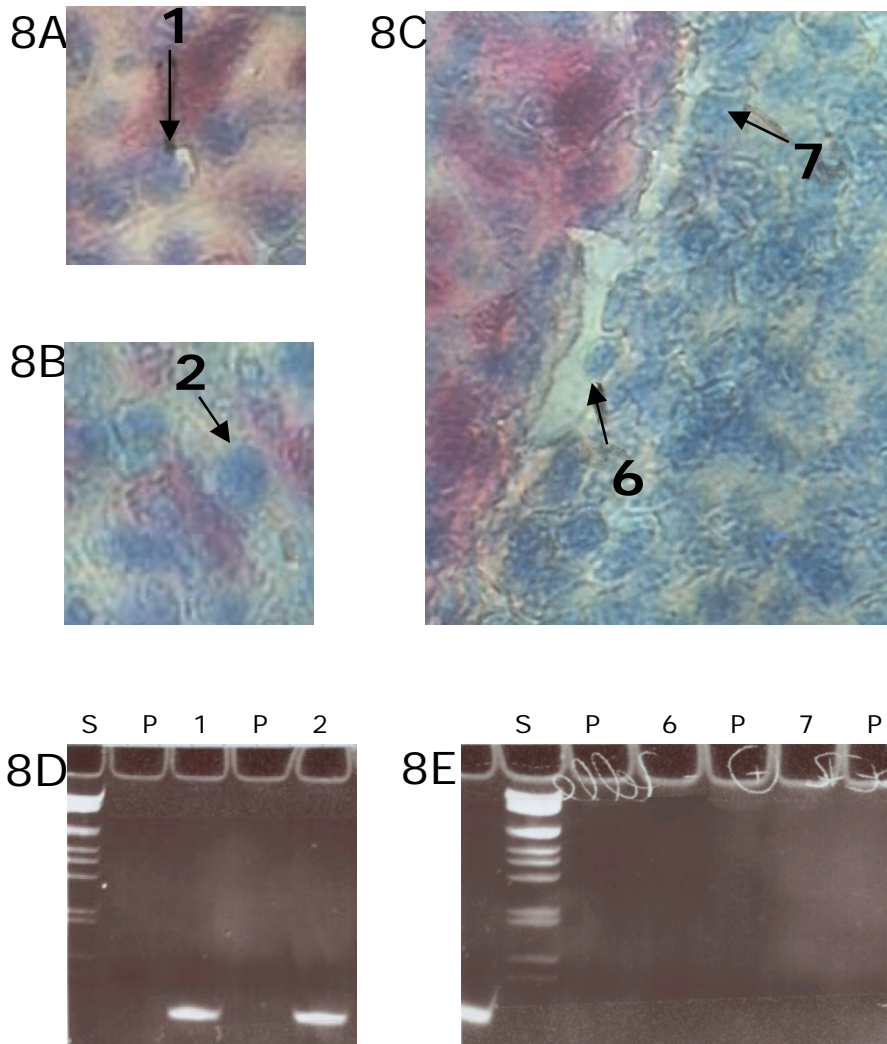
Probe G49: EBER-negativer Zellpool (10-15 Zellen) aus einer vollständig EBER-negativen Krypte, positiver EBV-DNA Nachweis in der EBV-Einzelzell-PCR.

Tumorzellen G50 und G51: EBER-negativ mit positivem EBV-DNA Nachweis in der EBV-Einzelzell-PCR.

Probe G36: Zwei EBER-negative Lymphozyten (Pool), positiver EBV-DNA Nachweis in der EBV-Einzelzell-PCR.

Beachte: Nach Isol. der Zelle G50 (Abb. 7C) sowie der Lymphozytenprobe G36 (Abb. 7E) keine Beschädigung der EBER-positiven Nachbarzellen.

Abb. 8: Nasopharynxkarzinom (Fall 8)



8A, 8B und 8C: EBER-ISH; Tumorzellen vor Isolierung.

8D und 8E: Korrespondierende Ergebnisse der EBV-DNA PCR der isolierten Zellen. Die Nummerierung der Spuren entspricht der Nummerierung der Zellen (S=Standart, P=Pufferprobe).

Tumorzellen 1 und 2: EBER-negativ mit positivem EBV-DNA Nachweis in der EBV-Einzelzell-PCR.

EBER-negative Lymphozyten 6 und 7 (in unmittelbarer Nähe zu EBER-positiven Tumorzellen): Negativer EBV-DNA Nachweis in der EBV-Einzelzell-PCR.