

# 1. Einleitung

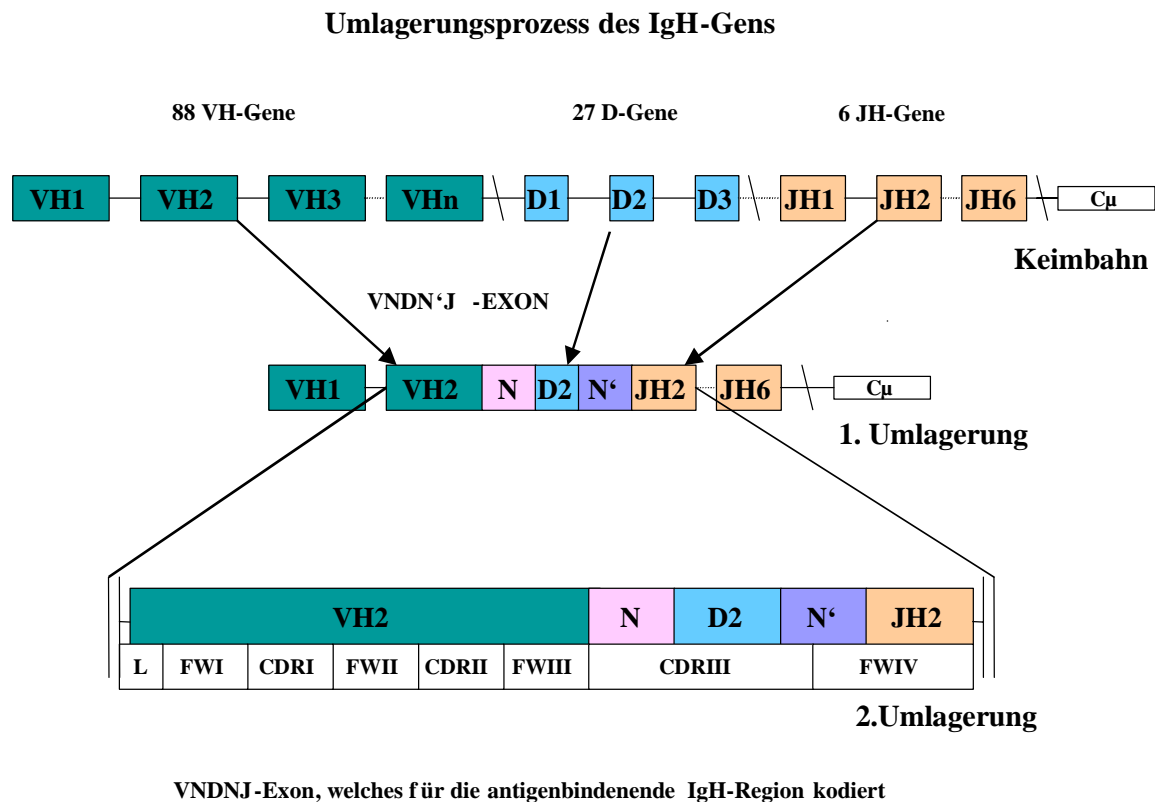
Seit langer Zeit hegen Zellbiologen, Pathologen und Virologen reges Interesse am Epstein-Barr Virus (EBV), da es mit zahlreichen Neoplasien in Verbindung gebracht wird. Das Ziel ist es, die Rolle des Virus bei der Entstehung der damit assoziierten Tumore zu verstehen, in der Hoffnung diese verhindern oder behandeln zu können. Um die Erkenntnisse über die Biologie des EBV zu erweitern, wurden zahlreiche Untersuchungen unternommen, die die Wege des Virus in die Zelle sowie die primär infizierten Zellen identifizieren sollten. Dazu wurde als Modellkrankheit die Infektiöse Mononukleose (IM) herangezogen, da sie die symptomatische Erstinfektion mit dem EBV darstellt. Im Rahmen dieser hier vorgelegten Arbeit wurden EBV-positive Zellen aus Gewebeproben von Patienten mit IM untersucht, um diese exakt zu charakterisieren und damit einen besseren Einblick in den Infektionsweg und die Strategien des EBV zu erhalten.

In den nachfolgenden Ausführungen werden die Infektiöse Mononukleose, das EBV sowie die B-Zellentwicklung näher beleuchtet, soweit es für das Verständnis dieser Arbeit erforderlich ist.

## 1.1. Die B-Zellentwicklung

Die B-Zellentwicklung beginnt im Knochenmark. Aus einer B-Zell-determinierten Stammzelle (Progenitor- bzw. Pro-B-Zelle) entwickeln sich über Prä-B-Zellen reife B-Zellen. Reife B-Zellen besitzen ein für sie charakteristisches Immunglobulinmolekül. Mit diesem Immunglobulinmolekül können sie „ihr“ spezifisches Antigen binden, weshalb diese Moleküle auch Antikörper, B-Zell- oder Immunglobulinrezeptoren genannt werden. Um den Körper vor einer Vielzahl an existierenden potenziellen Pathogenen zu schützen, findet in jeder B-Zelle eine Umlagerung der Immunglobulingene statt, die jede B-Zelle zur Synthese „ihres“ Antikörperrezeptors befähigt. Durch die Immunglobulingenumlagerung wird in den B-Zellen die Diversität der Antikörperrezeptoren erreicht, die notwendig ist, um eine große Anzahl an verschiedenen Antigenen binden zu können. Das Immunglobulinschwerkettengen in der Keimbahnkonfiguration besteht aus mehreren Gensegmenten: 88 Variability (V)-, 27 Diversity (D)- und 6 Joining (J)-Gensegmenten. Bei der Umlagerung wird durch die zufällige Auswahl je eines V-, D-, und J-Segments zuerst das Schwerkettengen (IgH) und dann das Leichtkettengen (IgL), welches jedoch im Gegensatz zu dem IgH-Gen keine Diversity-Gensegmente enthält, rekombiniert [1]. Durch diese Rekombination entstehen B-Zellen mit transkriptionsfähigen IgH- und IgL-Genen. Damit beginnt die Synthese vollständiger

Immunglobulinmoleküle, die auf der Zelloberfläche der reifen B-Zellen exprimiert werden. Die Abbildung 1.1. veranschaulicht den Umlagerungsprozess des Immunglobulinschwerkettengens.



**Abbildung 1.1. Schematische Darstellung des Immunglobulinschwerkettenumlagerungsprozesses**

In der Darstellung der Keimbahnkonfiguration sind die einzelnen Segmentgruppen durch unterschiedliche Farben symbolisiert. Von jeder Gruppe sind einzelne Segmente exemplarisch dargestellt.

VH: „variability“ Gensegmente des Immunglobulinschwerkettengens

D: „diversity“ Gensegmente des Immunglobulinschwerkettengens

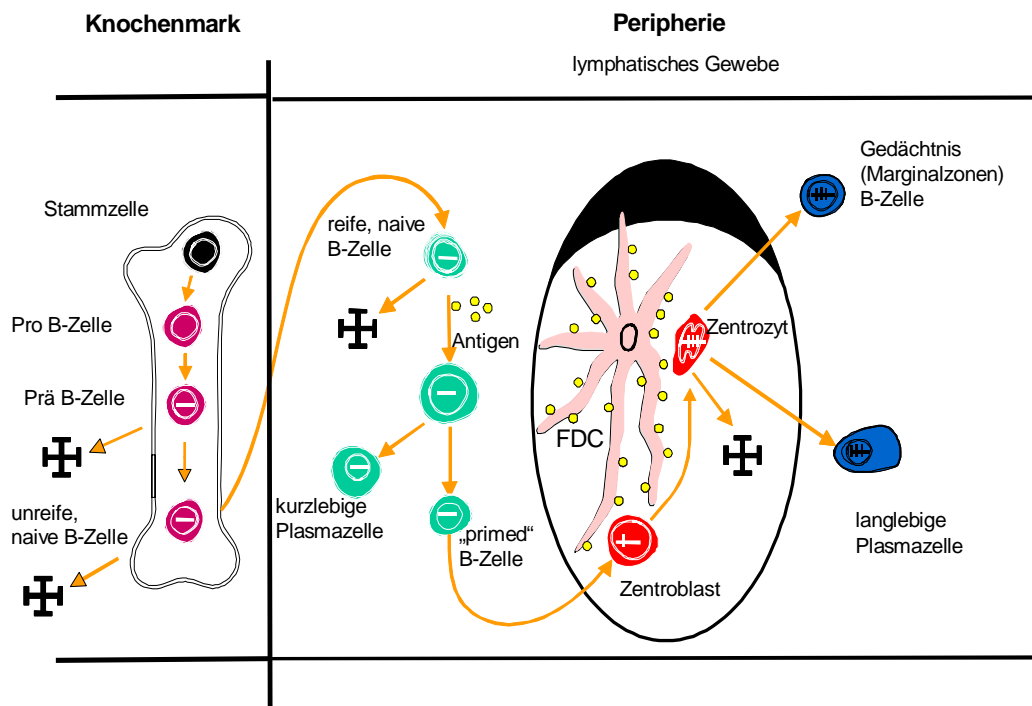
JH: „joining“ Gensegmente des Immunglobulinschwerkettengens

N und N': zufällige Oligonukleotidsequenzen

In allen Körperzellen liegen die Gensegmente des Immunglobulins getrennt voneinander in der Keimbahnkonfiguration vor. Im ersten Schritt der Umlagerung wird aus den 27 Diversity (D-) und den 6 Joining (JH-) Genen je eines ausgewählt und unter Herausschneiden dazwischenliegender Abschnitte in direkte Nachbarschaft zueinander gebracht. Zusätzlich werden zufällige unterschiedlich lange Oligonukleotidsequenzen (N') zwischen die umgelagerten D- und J-Segmente eingefügt [2]. Im zweiten Schritt erfolgt die Umlagerung eines der variablen (V-) Gensegmente. Hierbei wird aus den 88 VH-Gensegmenten eines ausgewählt und unter Herausschneiden dazwischenliegender Abschnitte in direkte Nachbarschaft zu dem bereits umgelagerten DJ-Bereich gebracht. Zusätzlich wird eine wiederum zufällige,

von dem bereits eingefügten N' verschiedene Oligonukleotidsequenz (N) zwischen den V und D Abschnitt eingebracht. Es resultiert ein V-N-D-N'-J Bereich, der für jede einzelne B-Zelle individuell unterschiedlich ist. Nach der anschließenden Umlagerung der leichten Kette des Immunglobulins, die nach dem gleichen Prinzip erfolgt, jedoch ohne Verwendung eines D-Segmentes, wird aus den umgelagerten Immunglobulinen durch Transkription und Translation ein Antikörpermolekül vom IgM- oder IgD-Typ synthetisiert, welches in der Membran einer reifen, naiven B-Zelle vorliegt und daraufhin überprüft wird, ob es körpereigene Strukturen erkennt. Bei einem Misserfolg der Umlagerung wegen der Ausrichtung des Antigenrezeptors gegen körpereigene Antigene oder einer nicht funktionalen Umlagerung wegen Leserasterverschiebungen oder Stopkodons im Immunglobulin, wird diese autoaggressive oder nicht funktionale B-Zelle durch Apoptose eliminiert. Danach kann die B-Zelle das Knochenmark verlassen. Sie zirkuliert mit dem Blut und siedelt sich in dem peripheren lymphatischen Gewebe (Lymphknoten, Milz, Mukosa assoziiertes lymphatisches Gewebe [*mucosa associated lymphoid tissue*; MALT]) als reife naive B-Zelle in Form von Primärfollikeln an.

Bei Antigenstimulation proliferieren die naiven antigenreaktiven B-Zellen. Ein Teil der Nachkommen differenziert in kurzlebige (3-5 Tage) Plasmazellen, die niedrig affine Antikörper meist vom IgM-Typ sezernieren (Primärantwort). Der andere Teil der Nachkommen differenziert in antigeninduzierte („*primed*“) B-Zellen, deren Funktion es ist, Keimzentren zu bilden oder als Nachschub in bestehende Keimzentren einzuwandern (siehe Abbildung 1.2.).



### Abbildung 1.2. Schematische Darstellung der Erzeugung, Reifung und Differenzierung der B-Lymphozyten

Dargestellt ist die im Text erläuterte Differenzierung der B-Zellen aus Vorläufer-B-Zellen über naive B-Zellen zu Gedächtnis- oder Plasmazellen durch die Teilnahme an der Keimzentrumsreaktion.

In den Zellen ist das umgelagerte Immunglobulingen als waagerechter Balken dargestellt. Das Vorliegen von somatischen Mutationen ist durch senkrechte Striche durch das Immunglobulingen (waagerechte Balken in den Zellen) symbolisiert.

Die im Keimzentrum ablaufenden Prozesse dienen der Affinitätssteigerung [3]. Es sollen hochaffine Immunglobuline entstehen, die von den Gedächtniszellen exprimiert und von langlebigen Plasmazellen als Antikörper sezerniert werden. Diese Affinitätsreifung erfordert molekulare Veränderungen der Immunglobuline. Im Rahmen der Keimzentrumsreaktion transformieren die antigeninduzierten („primed“) B-Zellen in stark proliferierende Zentroblasten, die die ruhenden B-Zellen an den Rand drängen, wodurch der Follikelmantel entsteht. Die Zentroblasten differenzieren weiter in Zentrozyten. Es entsteht die helle (zentrozytenreiche) und die dunkle (zentroblastenreiche) Keimzentrumszone. Bei der Proliferation der Zentroblasten und ihrer Differenzierung in Zentrozyten findet eine molekulare Veränderung statt: Es werden somatische Hypermutationen in die variablen Regionen der IgH- und IgL-Gene eingeführt [4] (in Abb. 1.2. sind die somatischen Mutationen als senkrechte Striche durch das umgelagerte Immunglobulingen [waagerechter

Balken] in den Zellen dargestellt). Somatische Hypermutationen stellen sich zum größten Teil als Austausch einzelner Nukleotide dar, es können aber auch Deletionen und Insertionen vorkommen. B-Zellen mit einer gesteigerten Affinität zu ihrem Antigen werden positiv selektiert und differenzieren weiter in langlebige Plasmazellen, die zur Synthese von hochaffinen Antikörpern befähigt sind oder in Gedächtnis-B-Zellen, die die hochaffinen Antikörper auf ihrer Oberfläche exprimieren. Diese positiv selektierten, zu Plasma- oder Gedächtniszellen differenzierten B-Zellen wandern ins Knochenmark, die Darmmukosa oder in die Schleimhäute aus.

Mutationen führen allerdings nicht immer zu einer Steigerung der Affinität des Rezeptors gegenüber dem Antigen. Diejenigen Zellen, deren Immunglobulinmoleküle durch die Keimzentrumsreaktion geringer affin oder ihre Kodierungsfähigkeit (durch Stopkodons oder Leserasterverschiebungen) verloren haben, werden durch Apoptose eliminiert.

## **1.2. Die Infektiöse Mononukleose**

Die Primärinfektion mit EBV findet gewöhnlich in der Kindheit statt; sie ist meist asymptomatisch oder zeigt nur unspezifische Symptome einer Atemwegserkrankung [5]. Je mehr sich die Infektion jedoch bis zum höheren Kindes- und Jugendalter verschiebt, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, eine symptomatische Erkrankung in Form der Infektiösen Mononukleose (IM) (Synonym: Pfeiffersches Drüsenfieber) zu entwickeln [6]. Die Übertragung des Virus erfolgt durch Tröpfcheninfektion, was ihr im englischsprachigen Raum die Bezeichnung "*kissing disease*" oder "*college disease*" einbrachte. Die Inkubationszeit beträgt 8 bis 21 Tage. Die IM ist eine selbstlimitierende Erkrankung. Von protrahierten Fällen [7;8] abgesehen, klingt sie innerhalb von vier Wochen ab. Aus der durchgemachten Infektion resultiert eine lebenslange Immunität gegen EBV [9]. Klinisch imponiert nach einem Prodromalstadium mit Abgeschlagenheit, Müdigkeit und Appetitlosigkeit ein ausgeprägter Krankheitszustand mit hohem Fieber, starken Halsschmerzen, Dysphagie und ausgeprägter Tonsillen- und Lymphknotenschwellung. Aufgrund der Beteiligung des retikuloendothelialen Systems können Milz und Leber ebenfalls vergrößert sein. Die Milzschwellung kann erhebliche Ausmaße annehmen und im Extremfall die Ruptur des Organs zur Folge haben. Serologisch können EBV-Antikörper nachgewiesen werden [10]. Im Blutausschlag findet man eine deutliche Leukozytose mit mononukleären Zellen. Histologisch erkennt man in den Tonsillen neben einer folliculären Hyperplasie, Expansion der Interfollikularzone und einer Verzerrung der gesamten Tonsillenarchitektur einzelne

Nekrosezonen meist angrenzend an Tonsillenkrypten [11;12]. Die Interfollikularzone ist gefüllt mit einem bunten Zellgemisch aus kleinen bis mittelgroßen Lymphozyten, Immunoblasten, Plasmazellen und Zellen mit einem auffällig großen Kern, die Reed-Sternberg-Zellen oder Hodgkin-Zellen ähneln [13]. Diese atypischen mononukleären Zellen haben der Erkrankung den Namen gegeben.

### **1.3. Das Epstein-Barr Virus**

#### **1.3.1 Die Entdeckung des Epstein-Barr Virus**

Entdeckt wurde das EBV vor 40 Jahren mit Hilfe der Elektronenmikroskopie aus Burkitt-Lymphom-Zelllinien von Epstein, Achong und Barr [14]. Sie konnten dieses Virus in allen Zellen des endemischen Burkitt-Lymphoms nachweisen und postulierten einen Zusammenhang zwischen der Infektion und der Entstehung des Tumors. Bereits vier Jahre später im Jahre 1968 wurde der Beweis des pathogenetischen Zusammenhangs zwischen der IM und EBV von Gertrud und Werner Henle erbracht [6]. In den 80er Jahren schließlich wies man das Virus in verschiedenen Non-Hodgkin-Lymphomen und oraler Haarleukoplakie von AIDS Erkrankten nach [15;16].

#### **1.3.2. Molekulare Eigenschaften des Epstein-Barr Virus**

Das EBV ist ein  $\gamma$ -Herpesvirus. Seine DNA ist von einer Kapsel umschlossen, welche wiederum von einer Virushülle umgeben ist. Man unterscheidet zwei Untergruppen des EBV: Typ 1 und Typ 2. Die Charakterisierung der beiden EBV-Subtypen erfolgte anhand der unterschiedlichen Größe ihrer EBNA-2 (*EBV nuclear antigens*) Moleküle (491 versus 443 Aminosäuren). Das EBV-Typ 1 ist effizienter in der Immortalisierung von B-Zellen als Typ 2 [17].

Das EBV enthält etwa 172 000 Basenpaare doppelsträngige DNA [18]. Potenziell kann das EBV für 100 Polypeptide kodieren, die aber nur zu einem Bruchteil auch tatsächlich exprimiert werden. Dazu gehören Kernantigene wie EBNA (*EBV nuclear antigens*) und ZEBRA (*BamHIZ encoded EBV replication trans-activator*) sowie Membranantigene (*latent membran proteins, LMPs*) und Kapsid- und Hüllproteine. Die wichtigsten viralen Genprodukte sind sechs nukleäre Proteine (*EBV nuclear antigens*): EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C und -LP (*Leader Protein*), drei latente Membranproteine: LMP-1, -2A und -2B sowie zwei nicht translatierte RNA-Moleküle: EBER-1 und -2 (*Epstein-Barr encoded RNA*).

Im Weiteren wird auf das Kernantigen EBNA-2 und das latente Membranprotein LMP-1 sowie die beiden EBER-Moleküle näher eingegangen.

**EBNA-2** stellt einen spezifischen Transaktivator dar, der zelluläre und einzelne Virusgene reguliert. In immortalisierten B-Zellen wird z.B. die Expression von zellulären Aktivierungsantigenen wie CD23, CD21 und von lymphozytären Funktionsantigenen wie CD11a, CD18 und CD58 durch EBNA-2 moduliert [19]. Neben der Überexpression zellulärer Moleküle durch EBNA-2 werden die EBV-kodierten latenten Membranproteine ebenfalls durch EBNA-2 hochreguliert [20] wie z.B. das latente Membranprotein 1 (LMP-1).

**LMP-1** ist der primäre Effektor des EBV-induzierten Wachstums [21]. In der Zellkultur hat es nachweislich transformierende Aktivität [22] und ist essenziell für die Transformation von B-Lymphozyten in vitro [23]. Die Mechanismen, die LMP-1 nutzt, um dies zu erreichen, ahmen die Mechanismen von wichtigen Mediatoren des lymphozytären Wachstums und der Aktivierung, wie z.B. die zellulären Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie CD30 und CD40 nach [24-27]: LMP-1 liegt wie CD30 und CD40 in der Zellmembran als Rezeptor verankert vor. Über den zytoplasmatischen Anteil können sie intrazelluläre Proteine, die TRAFs (*TNF-receptor-associated factors*) binden. Die TRAFs aktivieren den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, über den eine Zellproliferation vermittelt wird. Die phänotypischen Effekte sowohl von LMP-1 als auch von CD40 werden über die Aktivierung des selben Transkriptionsfaktors (NF- $\kappa$ B) vermittelt [28-30].

**EBER I** und **EBER II** (*EBV encoded nuclear RNAs*) sind zwei kurze, 165 bzw. 169 Basen umfassende RNA-Moleküle. Man findet sie in hoher Kopienzahl im Kern nahezu aller EBV-infizierten Zellen. Sie werden nicht in Proteine translatiert und ihre Funktion ist noch nicht vollständig geklärt [31;32]. Es gibt Hinweise dafür, dass die Expression der EBERs unabhängig vom EBV-Genom die Tumorentstehung fördert [33]. Desweiteren wird eine regulierende Funktion auf Splicing und Translation von EBV-RNA diskutiert [34].

### **1.3.2.1. Molekularpathologische Mechanismen während der Primärinfektion mit dem Epstein-Barr Virus**

Aus molekularpathologischer Sicht ist die Primärinfektion nicht vollständig geklärt, aber folgende Mechanismen spielen eine Rolle: Die Infektion von Lymphozyten ist von einer

starken Expression des Membranprotein CD21 abhängig [35]. An das CD21 Molekül bindet das Hauptglykoprotein der äußeren Hülle des EBV, das gp350/220 [36]. Nach der Bindung des gp350/220 an das CD21 Molekül erfolgt die Penetration der absorbierten Viruspartikel, die ebenfalls über CD21 vermittelt wird. Die Mechanismen allerdings, die zur Freisetzung des Genoms, dessen Transport zum Zellkern und die Bildung des Episoms, als welches das EBV meist im Zellkern vorliegt, sind noch nicht vollständig geklärt.

### 1.3.2.2. Latente versus lytische Infektion

Grundsätzlich unterscheidet man bei EBV-infizierten Zellen die latente und die lytische Infektion. Bei der latenten Infektion verbleiben in der Zelle eine bis wenige Kopien der Virus-DNA als Episome, die sich bei der Zellteilung replizieren und an die Tochterzelle weitergegeben werden. Somit bleibt die Anzahl der Viruskopien pro Zelle auch nach der Mitose weitgehend konstant. Im Gegensatz dazu werden bei der lytischen Phase alle viralen Gene aktiviert, die für die Erzeugung von kompletten Viruspartikeln notwendig sind [21;31;37]. Dadurch entstehen in kurzer Zeit große Mengen von infektiösen Virionen, was letztlich zur Lyse der Wirtszelle und zur Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln führt.

Die **latente** Infektion ist durch eine streng eingegrenzte Expression bestimmter viruskodierender RNAs und Proteine gekennzeichnet, die einerseits für die Aufrechterhaltung der Infektion nötig sind und eine Proliferation der vorher ruhenden Zelle verursachen können [38], andererseits aber auch Zielstrukturen für die spezifische immunologische Abwehr des Wirtsorganismus darstellen können.

Anhand der Kombination der exprimierten EBV-Genprodukte in einer latent infizierten Zelle unterscheidet man verschiedene Latenzformen [21;39-41]:

Latenzstadium I: Expression von EBNA-1 und EBER

Latenzstadium II: zusätzliche Expression von LMP-1 und LMP-2

Latenzstadium III: zusätzliche Expression von EBNA-2 und -3.

In der **lytischen** Phase findet man alle viralen Gene aktiviert, die im DNA-Metabolismus involviert sind. Man erkennt sie am Auftreten von ZEBRA (*BamHI*Z-encoded EBV replication trans-activator), einem DNA-bindenden Protein, welches andere Gene der lytischen Phase aktiviert. Die Expression von ZEBRA geht sowohl in B-Lymphozyten als



auch in Epithelzellen der Synthese von anderen Molekülen der lytischen Phase voraus [42]. Deswegen kann die Abwesenheit von ZEBRA als Hinweis auf das Vorliegen einer latenten Infektion dienen. Die Expression dieses Proteins andererseits bedeutet nicht, dass der replikative Zustand des Virus voll realisiert ist.

### **1.3.3. Identifizierung der primären Zielzelle des Epstein-Barr Virus**

Bald nach der Entdeckung des EBV in neoplastischen Lymphozyten des endemischen Burkitt-Lymphoms [43;44], wurde das EBV-Genom auch in Tumorzellen des undifferenzierten Nasopharynxkarzinoms [45] identifiziert. Zur weiteren Erforschung der Infektion von Epithelzellen wurden in den 70er und 80er Jahren abgeschilferte Zellen aus Mundspülungen von IM-Patienten mit Hilfe von in situ-Hybridisierungen untersucht [46]. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde virale DNA und RNA nur in Epithelzellen nachgewiesen. Aufgrund dessen wurde das Konzept etabliert, dass EBV primär Epithelzellen infiziert und es dann sekundär zu einer Infektion von benachbarten Lymphozyten kommt [21]. Die Annahme, dass Epithelzellen die primär infizierten Zellen des EBV darstellen, wurde weiter gestützt, als man 1985 eine Replikation des EBV bei der oralen Haarleukoplakie [47] entdeckte, die gehäuft bei AIDS Patienten auftritt.

Parallel zu diesen Untersuchungen, die einen Epitheltropismus des EBV nahelegten, entdeckte man neben der bekannten EBV-Assoziation des Burkitt-Lymphoms [43;44] das EBV zusätzlich in anderen Lymphomen. So wurde nachgewiesen, dass 40-60% der Fälle der Hodgkin-Lymphome [48] eine EBV-Assoziation aufweisen. Im Falle einer EBV-Assoziation beim Hodgkin-Lymphom sind alle Tumorzellen EBV infiziert [49]. Weitere Lymphome, in denen eine EBV-Infektion nachgewiesen werden konnte, sind in einzelnen Fällen Non-Hodgkin-Lymphome bei Immunkompetenten. Eine Ausnahme bildet das endemische Burkitt-Lymphom, welches regelmäßig mit EBV assoziiert ist. Die Häufigkeitsangaben einer EBV-Infektion bei Non-Hodgkin-Lymphomen schwanken je nach Untersucher und Entität zwischen 2 und 13%. Es konnte jedoch von Hummel et al. ein Zusammenhang zwischen der EBV-Infektionsrate und dem Malignitätsgrad der Non-Hodgkin-Lymphome erbracht werden [50]: Non-Hodgkin-Lymphome höheren Malignitätsgrads sind häufiger mit EBV assoziiert als solche niedrigeren Malignitätsgrads. Neben der relativ seltenen EBV-Assoziation bei Non-Hodgkin-Lymphomen in immunkompetenten Patienten, zeigte sich in wesentlich höherem Umfang eine EBV-Infektion in Non-Hodgkin-Lymphomen bei Immunsupprimierten, wie z.B. im Spätstadium der AIDS-Erkrankung oder nach iatrogenen Immunsuppression wie sie beispielsweise bei organtransplantierten Patienten vorgenommen werden muss. Diese

Beobachtungen wiederum ließen Zweifel an dem Konzept eines Epitheltropismus des EBV aufkommen und warfen die Frage nach der primär vom EBV infizierten Zielzelle auf. Zur Klärung dieser Frage wurden zahlreiche Studien unternommen. Letztlich konnten die Untersuchungen von Karajannis et al. [51] Klarheit schaffen. In dieser Studie wurden mononukleäre Zellen des peripheren Venenblutes und abgeschilferte Schleimhautzellen aus Mundspülungen von 16 Patienten mit akuter Infektiöser Mononukleose mit einer Kombination von Polymerasekettenreaktion, DNA und RNA in situ-Hybridisierungen sowie Immunzytologie untersucht. Latent EBV-infizierte Zellen waren in mononukleären Zellen des peripheren Venenblutes bei allen Patienten nachweisbar, während in den Mundspülungen bei nur drei Patienten EBV-positive Zellen auftraten. Diese Patienten litten zusätzlich unter einer eitrigen Tonsillitis. In diesen drei Fällen stellten sich die EBV-positiven Zellen als B-Lymphozyten dar, es ließen sich keine EBV-positiven Epithelzellen nachweisen. Damit hatten diese Untersuchungen gezeigt, dass B-Lymphozyten die primäre Zielzelle des EBV darstellen. Von den primär infizierten B-Zellen kann erst in zweiter Linie eine Infektion epithelialer Zellen stattfinden.

Damit war die primär vom EBV infizierte Zielzelle identifiziert. Anschließende Studien konnten das Differenzierungsstadium der Zelle, in der EBV persistiert, charakterisieren. In den post-Keimzentrums-Gedächtniszellen findet die lebenslange Persistenz des EBV statt [52-54].

Während die Fragen nach der primären Zielzelle und der Ort der Persistenz des EBV nun befriedigend geklärt sind, ist das Differenzierungsstadium der primär infizierten B-Zelle unklar. Auch besteht Unklarheit darüber, wie das EBV in den Pool der Gedächtniszell-B-Zellen gelangt, in dem es lebenslang persistiert.

Diese Fragen werden kontrovers diskutiert. Es existieren zwei Modelle, die das Differenzierungsstadium der primär infizierten B-Zelle und die Strategien des Virus in den Gedächtniszellpool zu gelangen erläutern. Das erste Modell wird hauptsächlich von der Arbeitsgruppe um Kurth et al. vertreten. Nach deren Vorstellungen infiziert EBV B-Lymphozyten aller Differenzierungsstufen, also auch post-Keimzentrums-Gedächtniszellen [55]. EBV gelangt demnach durch direkte Infektion der post-Keimzentrumszellen in den Zellpool, in dem es ein Leben lang persistiert.

Das zweite Modell wird von der Arbeitsgruppe um Babcock et al. beschrieben. Sie sind der Ansicht, dass EBV ausschließlich naive B-Zellen infiziert. Die Entstehung von mutierten post-Keimzentrumszellen erfolge durch die aktive Teilnahme EBV-infizierter Zellen an der Keimzentrumsreaktion [56].

Diese beiden sehr unterschiedlichen Vorstellungen über das Differenzierungsstadium der primär vom EBV infizierten Zellen sowie über die Strategien des EBV in den Gedächtniszellpool zu gelangen, waren der Anlass, diese Fragestellungen im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit näher zu beleuchten. Von der Klärung der Fragen erwartet man ein erweitertes Verständnis der Primärinfektion mit dem EBV, in der Hoffnung, die mit dem EBV-assoziierten Neoplasien besser verstehen und damit behandeln oder sogar verhindern zu können.

### **Fragestellung**

Da nach wie vor unklar ist, welches Differenzierungsstadium die primär vom EBV infizierten B-Zellen aufweisen und welche Strategie das EBV nutzt um seine Persistenz im Gedächtniszellpool zu erreichen, wurde die hier vorliegende Arbeit initiiert. Dazu wurde die Infektiöse Mononukleose als Modellkrankheit für die Primärinfektion mit dem EBV herangezogen. Es standen drei Tonsillen und ein Lymphknoten von vier Patienten, die an akuter Infektiöser Mononukleose erkrankt waren, zur Verfügung. Von den Tonsillen und dem Lymphknoten sollten immungefärbte Gefrierschnitte angefertigt werden und EBV-infizierte B-Lymphozyten einzeln isoliert sowie deren umgelagerte Immunglobulingene mit Einzelkopie-PCR amplifiziert und sequenziert werden. Durch den Vergleich der erhaltenen Sequenz mit bekannten Sequenzen der Immunglobulingenkeimbahnsegmente sollte der Differenzierungszustand dieser B-Lymphozyten bestimmt werden.