

# **Molekulare und serologische Untersuchungen bei pädiatrischen Patienten mit Nasopharynxkarzinom**

## **Inauguraldissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Caroline Rosalie Gauch**  
aus Ludwigshafen am Rhein

Gießen 2016

Aus dem medizinischen Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin,  
Abteilung für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie  
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH  
Standort: Gießen  
Leiter: Prof. Dr. med. D. Körholz

1. Gutachter: Prof. Dr. med. H. J. Wagner
2. Gutachter: Prof. Dr. med. J. P. Klußmann

Tag der Disputation: 08.05.2017

# INHALTSVERZEICHNIS

## INHALTSVERZEICHNIS.....I-II

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das Epstein-Barr-Virus (EBV).....</b>	<b>1</b>
1.1.1	EBV-Genom.....	1
1.1.2	Replikationszyklus.....	3
1.1.2.1	Lytische Phase.....	3
1.1.2.2	Latente Phase.....	4
1.1.3	Pathogenese und Symptomatik.....	5
1.1.4	Diagnostik.....	9
1.1.5	Therapie.....	11
<b>1.2</b>	<b>Das Nasopharynxkarzinom (NPC).....</b>	<b>11</b>
1.2.1	Epidemiologie.....	11
1.2.2	Ätiologie.....	12
1.2.3	Histologie und Klassifikation.....	12
1.2.4	Symptomatik.....	13
1.2.5	Diagnostik des NPC.....	14
1.2.6	Therapie.....	15
1.2.6.1	Operative Therapie.....	15
1.2.6.2	Radiochemotherapie.....	15
1.2.7	Prognose.....	17
<b>1.3</b>	<b>Ziele dieser Arbeit.....</b>	<b>18</b>
<b>2.</b>	<b>PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Patienten.....</b>	<b>19</b>
2.1.1	Nasopharynxkarziom-Patienten.....	19
2.1.2	Kontrollgruppe.....	19
<b>2.2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>21</b>
2.2.1	Überblick zum Versuchsablauf.....	21
2.2.2	Probengewinnung.....	21
2.2.3	Isolation von DNA.....	22
2.2.4	Bestimmung der Konzentration von DNA.....	23
2.2.5	Qualitative Polymerase-Kettenreaktion in Echtzeit (real time quantitative polymerase chain reaktion (RQ-PCR)).....	24
2.2.5.1	Prinzip.....	24
2.2.5.2	Assay.....	28
2.2.6	EBV-Serodiagnostik.....	29
2.2.6.1	Serologie.....	29
2.2.6.2	ELISA zur Bestimmung von EBV-spezifischen Antikörpern.....	29

<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>Serologien.....</b>	<b>33</b>
3.1.1	Auswertung der Serologien bei NPC-Patienten in kompletter Remission.....	34
3.1.1.1	Bestimmung von EBNA-1-IgG.....	34
3.1.1.2	Bestimmung von EA-IgG.....	35
3.1.1.3	Bestimmung von EA-IgM.....	36
3.1.1.4	Bestimmung von EA-IgA.....	37
3.1.2	Auswertung der Serologien bei den NPC-Patienten mit einem Rezidiv.....	38
<b>3.2</b>	<b>Quantifizierung von EBV-DNA in PBMCs.....</b>	<b>39</b>
<b>3.3</b>	<b>Quantifizierung von EBV-DNA im Plasma.....</b>	<b>40</b>
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>47</b>
4.1	EBV-Lastmessung im Plasma bei NPC-Patienten.....	47
4.2	EBV-Lastmessung in PBMCs bei NPC-Patienten.....	48
4.3	EBV-Serologie bei NPC-Patienten.....	49
4.4	Schlussfolgerung.....	50
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>51</b>
<b>6.</b>	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>52</b>
<b>7.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>53</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>55</b>
<b>9.</b>	<b>EHRENWÖRTLICHE ERKÄRUNG.....</b>	<b>61</b>
<b>10.</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>62</b>

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Das Epstein-Barr-Virus (EBV)

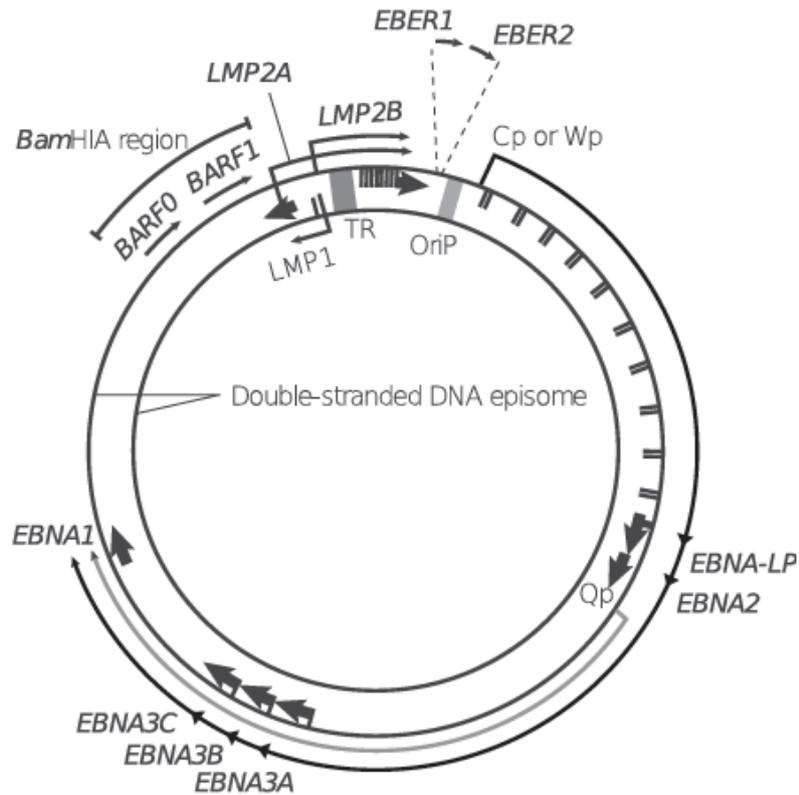
Das Epstein-Barr-Virus, das Humane-Herpes-Virus 4, ist ein humanpathogenes, behülltes, doppelsträngiges DNA-Virus aus der Familie der Herpesviridae, mit dem die Mehrheit der Weltbevölkerung infiziert ist und das latent im Organismus persistiert (Henle W. and Henle G., 1979). Den Namen Epstein-Barr erhielt es nach den Erstbeschreibern Michael Epstein und Yvonne M. Barr, die 1964 EBV in Burkitt-Lymphomzelllinien eines afrikanischen Patienten nachwiesen.

Tröpfen- oder Kontaktinfektionen über Speichel machen den Hauptteil des Übertragungsweges aus, seltener sind Übertragungen im Rahmen von Transplantationen oder Bluttransfusionen.

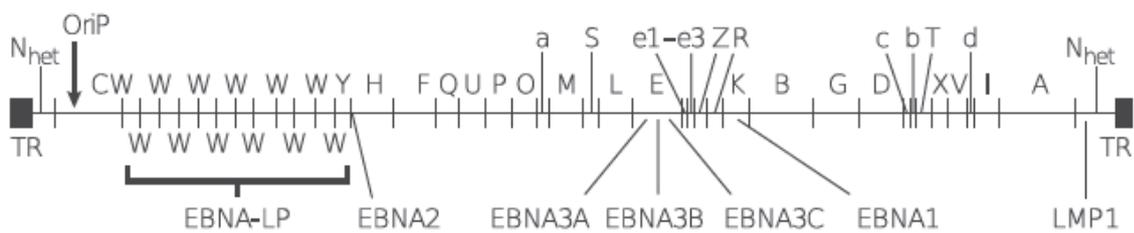
### 1.1.1 EBV-Genom

Das EBV-Genom besteht aus einer linearen doppelsträngigen DNA, mit einer Größe von etwa 172 kb, welche für 85 Gene kodiert. Im Zellkern infizierter Zellen liegt das EBV-Genom entweder als kovalent geschlossenes oder episomal replizierendes Molekül vor (Lindahl T. et al., 1976). Es kann sich auch in das Wirtsgenom integrieren (Henderson A. et al., 1983). Auffällig hoch ist der GC-Gehalt mit etwa 60% (Hayward S.D. and Kieff E., 1977). Die Nomenklatur der ORFs (*open-reading frames*) des EBV basiert auf den BamHI-Restriktions-Fragmenten, in denen diese liegen. Die meisten ORFs des EBV sind in latente oder lytische Gene wie auch in sehr frühe, frühe und späte Gene unterteilt. Viele dieser Gene werden in Proteinen translatiert, wobei bei einigen späten Genen wie EBER (*EBV-encoded RNA*)-1 und -2 keine Translation stattfindet (Kieff E. and Rickinson A.B., 2001).

Das virale Genom enthält auch eine Reihe von 0,5 kb große terminale direkte Wiederholungssequenzen an jedem Ende sowie interne Wiederholungssequenzen, die dazu dienen, das Genom in kurze und lange Sequenzbereiche zu unterteilen, die die meisten der Kodierkapazität besitzen (Cheung A. and Kieff E., 1982). Diese terminalen Wiederholungssequenzen sind gute Marker zur Bestimmung der Herkunft und Abstammung EBV-infizierter Zellen (Raab-Traub N. and Flynn K., 1986).



**Abb. 1:** Schematische Darstellung des doppelsträngigen EBV-Episoms über die Lokalisation und Transkription der latenten Gene von EBV (Iarc Monographs - 100B, S. 50).



**Abb. 2:** Lokalisation der ORFs (*open-reading frames*) der latenten EBV-Proteine auf der BamHI-Restriktionsendonuklease-Karte des Prototyps B95.8 Genom (Iarc Monographs - 100B, S. 50).

### 1.1.2 Replikationszyklus

Bei der Vervielfältigung des EBV unterscheidet man einen lytischen und einen latenten Zyklus. Bei einer latenten Infektion kommt es zur persistenten Infektion der infizierten Zellen ohne eine Ausbildung vollständiger Viruspartikel, so dass die virale DNA dem Replikationszyklus der Wirtszelle unterliegt (Aiyar A. et al., 1998). In den sogenannten „Producer-Zelllinien“ hingegen läuft der lytische Zyklus ab, wobei es zur zahlreichen Bildung von Virionen und zur Lyse der Wirtszelle kommt. Ein höherer Übergang der Zellen in den lytischen Zyklus kann u. a. durch eine Induktion mit 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) oder anti-Immunglobulin-Antikörpern erreicht werden (Takada K. et al., 1999). Eine Unterscheidung zwischen lytischer und latenter Phase ist anhand des Expressionsmusters der viralen Proteine möglich.

#### 1.1.2.1 Lytische Phase

In der lytischen Phase des EBV-Zyklus findet die Produktion von infektiösen Viruspartikeln statt. Hierbei kommt es zu einer Expression von mehr als 80 viralen Proteinen wie Transkriptionsaktivatoren, DNA-Replikationsfaktoren und Strukturproteine. Zudem werden Proteine exprimiert, die die Immunantwort des Wirts beeinträchtigen (Kieff E. and Rickinson A., 2006). Insgesamt wird das Genom von EBV in diesem produktiven Zyklus um etwa 100- bis 1.000-fache vervielfacht (Tsurumi T. et al., 2005). In den sogenannten Replikationskompartimenten des Zellkerns findet die Replikation von EBV statt. Vermutlich erfolgt die Aktivierung des lytischen Programms in latent infizierten B-Zellen, welche durch das lymphatische Gewebe im Bereich des Nasopharynx zirkulieren, wobei die auslösenden Faktoren bisher noch unbekannt sind (Faulkner G.C. et al., 2000). Nachdem EBV aktiviert worden ist, kommt es zu einer kaskadenartigen Aktivierung lytischer Gene, die nach der Reihenfolge des Auftretens ihrer Genprodukte in sehr frühe (*immediate early*, IE), frühe (*early*, E) und späte (*late*, L) Gene unterteilt werden.

### 1.1.2.2 Latente Phase

In der Latenzphase des Zyklus von EBV werden keine infektiösen Viren hergestellt, lediglich wird eine geringe Anzahl an EBV-Latenzgenen exprimiert. Hierzu gehören zwei kleine, nicht-polyadenylierte RNAs (*EBV-encoded small RNA*: EBER-1 und -2), sechs Kernproteine (*EBV-encoded nuclear antigen*: EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C und -LP (*leader protein*)) sowie zwei Membranproteine (*latent membrane protein*: LMP-1, -2A oder -2B). Zur Immortalisierung der Wirtszellen wird nur EBNA-1, -2, -3A, -3C, -LP und LMP-1 notwendig (Kaye K.M. et al., 1993). Bei den in der Latenz befindlichen Zellen existieren vier unterschiedliche Expressionsmuster.

Im Latenztyp 0 werden ausschließlich EBERs, welcher sich in den nicht proliferierenden Gedächtnis-B-Zellen zeigt, und im Latenztyp I neben den EBERs als einziges weiteres EBV-Protein EBNA-1 exprimiert. Letzterer Latenztyp wird in den Burkitt-Lymphomzellen beobachtet. Im Latenztyp II kommt es zur Expression von viralen Proteinen wie EBNA-1, LMP-1 und LMP-2 sowie EBERs (Kuppers R., 2003). Dieser Latenztyp kommt außer in Hodgkin-Lymphomen auch in verschiedenen EBV-assoziierten epithelialen Tumoren, wie z. B. in Nasopharynxkarzinomen, vor. Im Latenztyp III werden alle Latenzgene exprimiert, die für sechs nukleäre EBV-Proteine (EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C und EBNA-LP) und zwei latente Membranproteine (LMP-1, LMP-2A oder LMP-2B) kodieren. Weiterhin werden zwei kleine, nicht-kodierende RNAs (EBER-1 und -2) und Transkripte der BamHI-A-Region (BARTs) exprimiert. Diese Latenzform zeigt sich in EBV-assoziierten B-Zell-Lymphomen bei Immundefizienten wie z. B. in PTLDs (*post-transplant lymphoproliferative disorders*) und in Patienten mit einer akuten infektiösen Mononukleose.

In Studien wurden festgestellt, dass EBNA-2 und LMP-1 im Prozess der Immortalisierung die Schlüsselrollen spielen und EBNA-1, -3A, -3C und -LP von Bedeutung sind (Young L.S. and Rickinson A.B., 2004). EBNA-2 reguliert durch Interaktion mit dem zellulären Transkriptionsfaktor RBP-J $\kappa$  (*recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region*) die Transkription von viralen und zellulären Genen wie z. B. CD (*cluster of differentiation*) 21, *c-fgr* (*Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog*), MYC (*myelocytomatosis oncogene*) und CD23 (Cordier M. et al., 1990). EBNA-LP kooperiert mit EBNA-2 und erhöht so

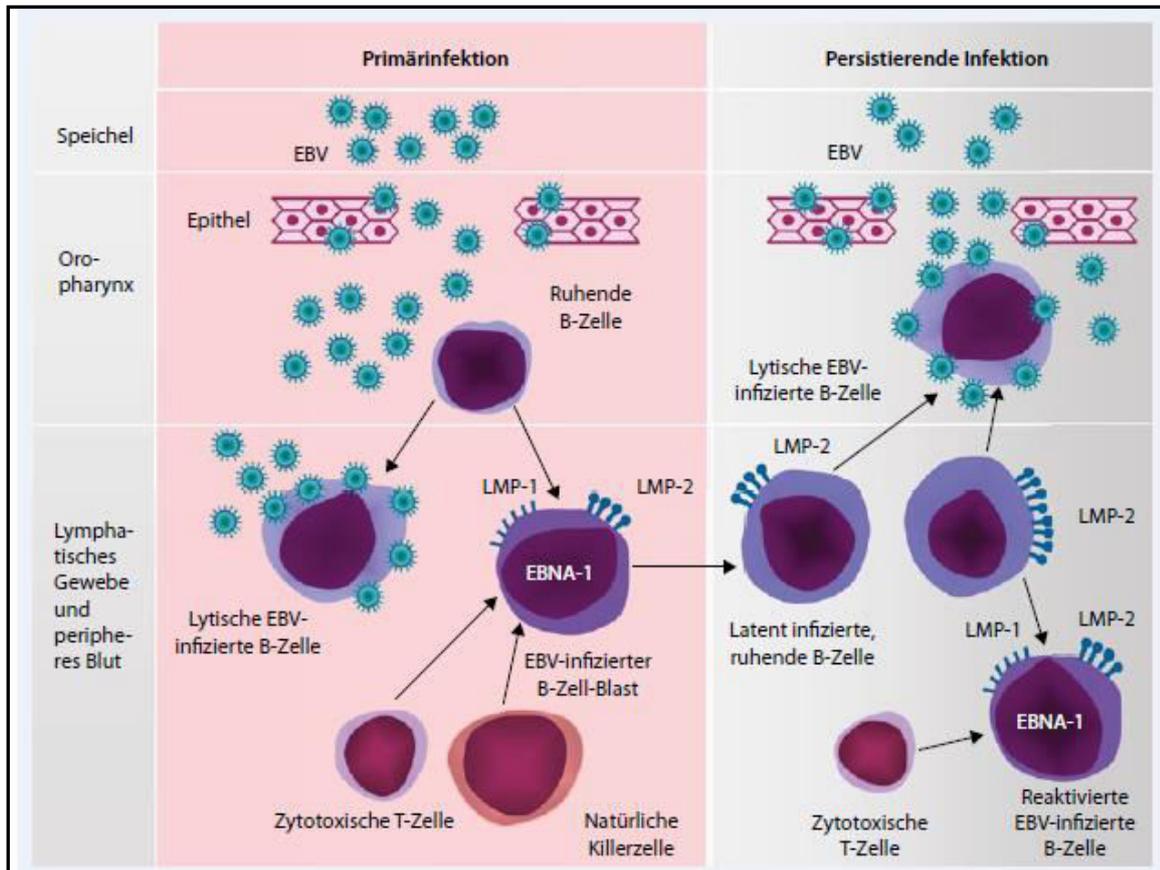
das Aktivierungspotenzial von EBNA-2 zur Transformation der B-Lymphozyten. (Sinclair A.J. et al., 1994). EBNA-3 ist an der Regulation der Transkription sowie der Proliferation von infizierten B-Lymphozyten beteiligt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass innerhalb der Proteinfamilie von EBNA-3 nur EBNA-3A und EBNA-3C eine wichtige Rolle bei der Transformation von B-Lymphozyten haben. EBNA-3B zeigte dieses nicht (Tomkinson B. and Kieff E., 1992). Das DNA-bindende Protein EBNA-1 ist neben der viralen DNA-Replikation des episomalen EBV-Genoms (Yates J.L. et al., 1985) auch für die Erhaltung des viralen Episoms in infizierten Zellen bei der Zellteilung verantwortlich (Lee M.A. et al., 1999). Für die Aktivierung und Förderung des Überlebens der B-Lymphozyten sind die Transmembranproteine LMPs maßgebend. Während LMP-2A oder -2B nicht essentiell für die EBV-induzierte Transformation von B-Lymphozyten sind (Longnecker R., 2000), besitzt LMP-1 eine Schlüsselfunktion im Transformationsprozess (Kaye K.M. et al., 1993). LMP-1 ähnelt dem CD40-Rezeptor der B-Lymphozyten, welcher für die Aktivierung und Differenzierung der B-Lymphozyten verantwortlich ist. (Kilger E. et al., 1998).

Die EBERs werden in allen Latenzformen exprimiert, sind aber dennoch nicht essentiell für die Transformation von B-Lymphozyten. Die Funktion von BART-RNAs in EBV-infizierten Zellen ist bisher unbekannt (Young L.S. and Murray P.G., 2003).

### 1.1.3 Pathogenese und Symptomatik

EBV infiziert im Oropharynx ruhende B-Lymphozyten und Epithelzellen (Abb. 4, Cohen J.I., 2000). In der Primärinfektion durchlaufen EBV-infizierte B-Lymphozyten eine lytische Infektion mit Produktion des Virus und Expression aller latenten viralen Proteine. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und zytotoxische T-Zellen kontrollieren beim Immunkompetenten die EBV-infizierten B-Lymphozyten. Nach Konvaleszenz verbleibt EBV in der latenten Form der infizierten B-Gedächtniszelle, so dass diese das latente Membranprotein LMP-2 und das nukleäre Antigen EBNA-1 exprimiert. EBV kann sich in den latent infizierten B-Gedächtniszellen reaktivieren und somit weitere latente virale Proteine exprimieren, das bei ausreichender Immunkompetenz zur Erkennung und Destruktion durch zytotoxische T-Lymphozyten führt. Einige latent infizierte B-Lymphozyten können erneut eine lytische Infektion im Oropharynx

durchlaufen und so die Produktion und Absonderung des EBV in den Speichel oder eine Infektion der oropharyngealen Epithelzellen auslösen (Abb. 3; Cohen J.I., 2000).

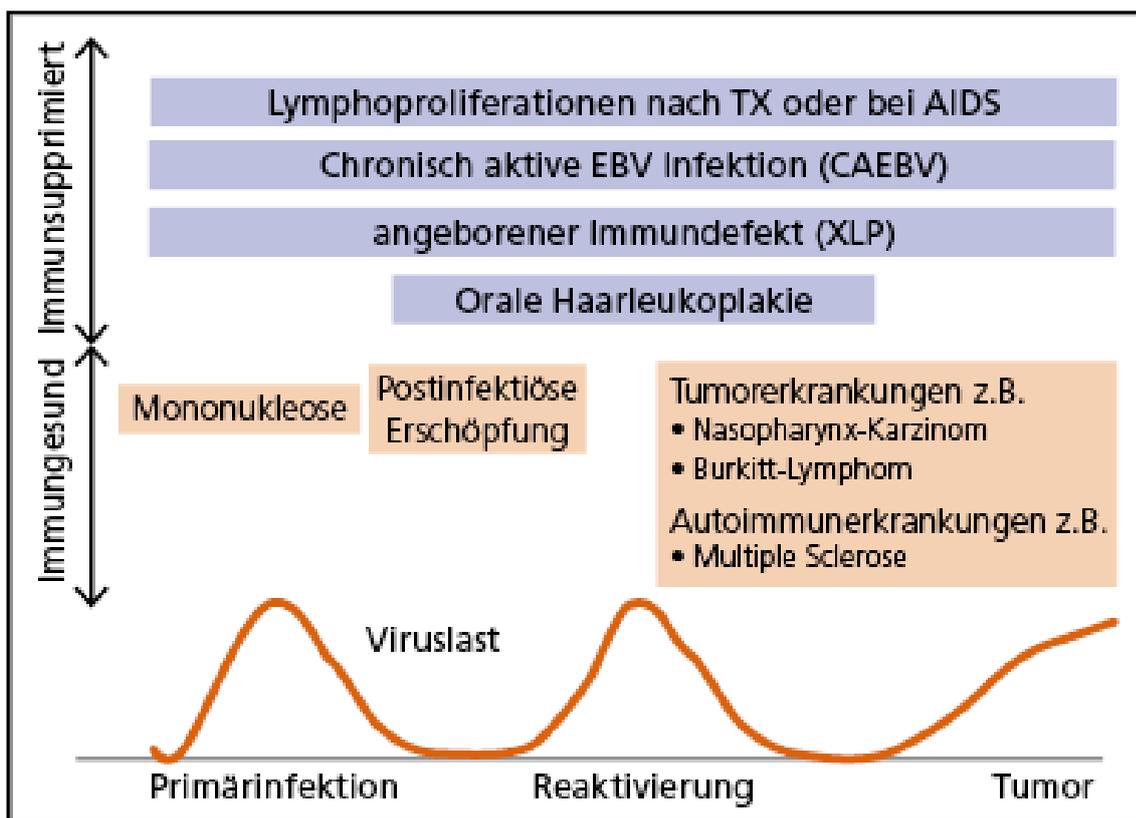


**Abb. 3:** Modell der Epstein-Barr-Virus (EBV)-Infektion beim Immungesunden (Adaptiert nach Cohen J.I., 2000).

Zumeist läuft die Infektion im Säuglings- und Kindesalter ab und ist meist asymptomatisch. Bei Infektionen von Jugendlichen oder Erwachsenen kommt es typischerweise zum Ausbruch der infektiösen Mononukleose (Pfeiffer-Drüsenfiebers) (Henle W. and Henle G., 1979). Hierbei können neben der Symptomtrias Fieber, Lymphadenopathie und Pharyngitis auch eine Hepatosplenomegalie und eine atypische Lymphozytose auftreten. Als Organmanifestationen können Hepatitis, Pneumonie, Exanthem, gastrointestinale Symptome sowie hämatologische Veränderungen auftreten. Ab dem 40. Lebensjahr sind etwa 98 % der Weltbevölkerung mit EBV infiziert.

Bei einer Immundefizienz kann sich das Virus unkontrolliert vermehren und maßgebend zur Entstehung von verschiedenen seltenen Krebserkrankungen sein. So kann EBV zur Entstehung von Hodgkin-Lymphom, Burkitt-Lymphom sowie weiteren

Lymphomen wie z. B. PTLD (*post-transplant lymphoproliferative disorder*) beitragen (Maeda E. et al., 2009; Ghandi M.K., 2006; Rezk S.A. and Weiss L.M., 2009; Rowe M. et al., 2009). EBV-Infektionen werden auch mit einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen, wie z. B. Multipler Sklerose, systemischem Lupus erythematodes und der rheumatoiden Arthritis in Verbindung gebracht (Toussirot E. and Roudier J., 2008; Bagert B.A., 2009). EBV-Infektionen gelten auch als Risikofaktor für Nasopharynxkarzinome. Hierbei ist EBV notwendig für die Krebsentstehung, jedoch nicht allein ausreichend, wie die geringe Anzahl der Tumorerkrankungen im Vergleich zur Virusverbreitung zeigt. Einen Überblick über EBV-assoziierte Erkrankungen zeigt die Abbildung 4. Die Abbildung 5 stellt einige EBV-assoziierte Krebserkrankungen sowie deren besonderen Merkmale in tabellarischer Form dar.



**Abb. 4:** Verlauf einer EBV-Infektion und assoziierte Erkrankungen bei Immungesunden und Immunsupprimierten: Bei Immungesunden kann es zur infektiösen Mononukleose sowie anschließend zu einer postinfektiösen Erschöpfung kommen. Es können auch EBV-assoziierte Tumorerkrankungen in einer späteren Phase entstehen wie z. B. das Nasopharynxkarzinom. Die Immundefizienten entwickeln neben einer oralen Haarleukoplakie häufig auch EBV-assoziierte Tumorerkrankungen wie Hodgkin-Lymphom, Burkitt-Lymphom sowie weiteren Lymphomen wie z. B. PTLD (Journal Med, Schwerpunkt des Monats 07/2012, EBV-assoziierte Erkrankungen Prof. B. C. Gärtner und Prof. M. Herrmann, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Homburg/Saar).

	EBV-assoziierte Neoplasien	Prävalenz von EBV	Charakteristika
1)	Burkitt-Lymphom	EBV wurde in nahezu allen Fällen der endemischen Variante, in 15-20% der Fälle der sporadischen Variante und in 30-40% der Fälle der HIV-assoziierten Variante entdeckt	nur EBNA-1 zusammen mit zwei nicht translatierten RNAs (EBERs) und einige mikro-RNAs sind nachgewiesen
2)	Nasopharynxkarzinom (NPC)	fast 100% des nichtverhornenden NPC tragen das klonale EBV-Genom und exprimieren EBV-Proteine	Gen-Produkte des Latenztyps II, wie LMP 2A und LMP-1 werden in einer Teilmenge des NPC exprimiert
3)	Klassisches Hodgkin-Lymphom	eine EBV-Infektion ist mit ungefähr 40% des klassischen Hodgkin-Lymphoms assoziiert, am häufigsten mit der gemischtzelligen Form	Gen-Produkte des Latenztyps II, EBERs, EBNA-1, LMP-1 und LMP-2A werden typischerweise exprimiert
4)	Posttransplantation lymphoproliferative Erkrankungen (Post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD))	EBV infiziert ~60-80% der PTLD-Patienten, einschließlich 100% der Patienten mit früh einsetzender PTLD	die meisten PTLD-Tumor-Zellen exprimieren das Latenztyp III-Muster der EBV-Genexpression mit einem kleinen Anteil an Zellen, die den lytischen Zyklus durchlaufen. Gelegentlich werden Typ I- und Typ II-Latenzmuster in Biopsien von PTLD entdeckt. In diesen Fällen sind wahrscheinlich zusätzlich genetische oder epigenetische Veränderungen für die Tumorausbreitung nötig
5)	Lymphoproliferative Erkrankungen	90 %	Latenztyp III, EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, LMP-1, LMP-2A oder LMP-2B
6)	T-Zell-Lymphom	10 %	Latenztyp II, EBNA-1, LMP-1, LMP-2A oder LMP-2B werden exprimiert
7)	Extranodales NK/T-Zell-Lymphom nasal Typ	~100 %	Latenz Typ II, Fehlen von T-Zell-Antigenen, Expression von NK-Zellmarker CD56 und Fehlen von T-Zell-Rezeptor-Gen-Rearrangement
8)	Magenkarzinom	10% aller Fälle von Magenkarzinomen	alle Fälle von EBV-assoziierten Magenkarzinomen exprimieren das LMP-2A, welches das zelluläre <i>Überlebens-Gen</i> über den Weg von NF- $\kappa$ B ( <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> ) hochreguliert, was eine Resistenz der neoplastischen Zellen über apoptotische Stimuli verleiht. EBERs werden auch in fast jeder EBV-Magenkarzinom-Zellen exprimiert, was auf die Wichtigkeit für die Entwicklung und Aufrechterhaltung dieses Karzinoms hinweist

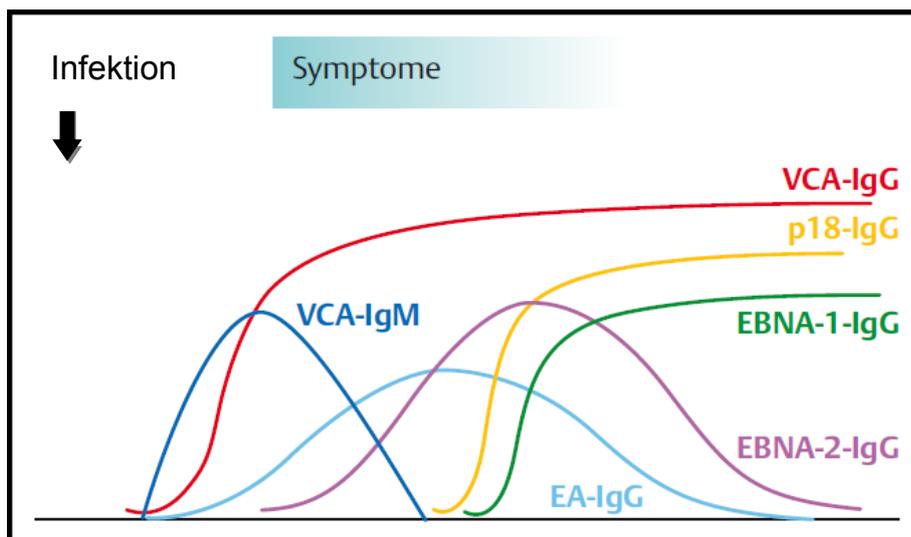
Legende: EBNA = *EBV-encoded nuclear antigen*, LMP = latent membrane protein, EBER = *EBV-encoded small RNA*

**Abb. 5:** EBV-assoziierte Tumore und deren besondere Merkmale, aus dem Englischen übersetzt und aktualisiert (S. Ocheni et al., 2010).

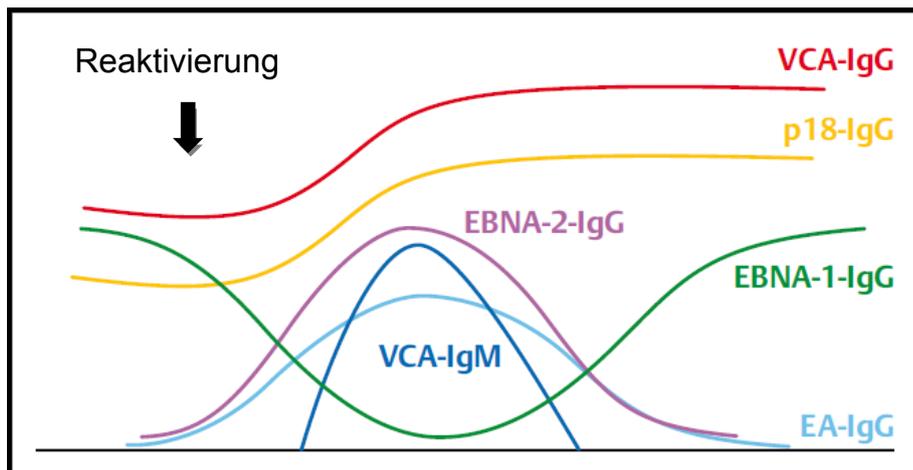
#### 1.1.4 Diagnostik

Anzeichen für eine infektiöse Mononukleose können neben der Symptomatik wie hohes Fieber, geschwollene Lymphknoten, Tonsillopharyngitis sowie Hepatosplenomegalie auch Veränderungen des Blutbildes sein. Neben einer Vermehrung der Lymphozyten treten vergrößerte atypische T-Lymphozyten, die sogenannten Pfeifferzellen, auf. Weiterhin sind zur Diagnosestellung die EBV-spezifische Antikörper essentiell. Der Beginn der Infektion ist zunächst symptomlos trotz einer Virusvermehrung. Erst nach der Aktivierung der zellulären Immunantwort treten die Symptome auf, was die lange Inkubationszeit von etwa von 10 bis 50 Tage erklärt. Zur serologischen Diagnostik werden drei unterschiedliche Antikörper verwendet:

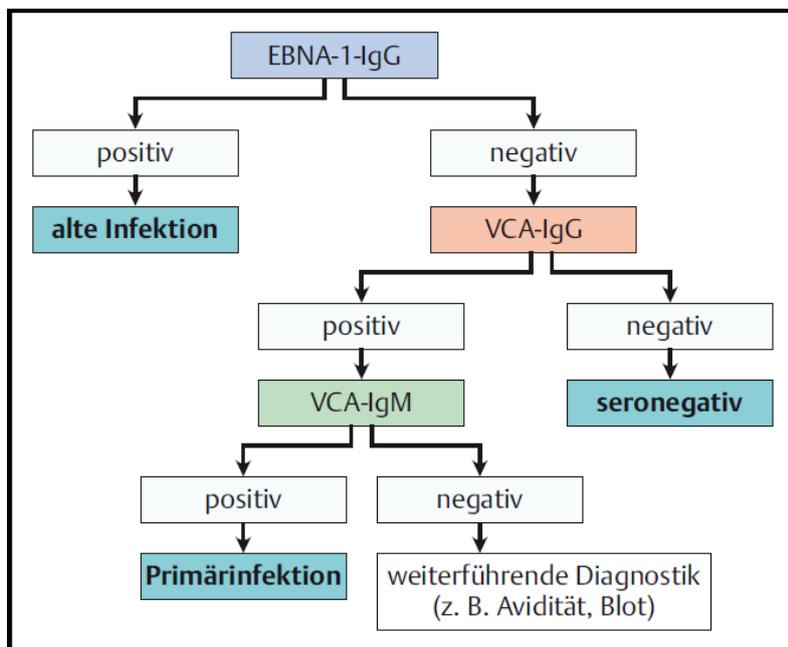
Zur Diagnose einer akuten Infektion dienen die Antikörper VCA-IgM und -IgG. EBNA-1-IgG ist in den ersten vier Wochen nach Krankheitsbeginn meist negativ, jedoch positiv nach einer durchgemachten oder reaktivierten Infektion, so dass das Fehlen für die Primärinfektion richtungweisend ist. Abbildungen 6 und 7 stellen den Verlauf der Serologie in der Primärinfektion beim Immungesunden als auch in der späteren Reaktivierung dar und Abbildung 8 zeigt ein Schema zum Ablauf bzw. zur Interpretation der immunglobulinklassenorientierten Diagnostik.



**Abb. 6:** Der Verlauf der Antikörper während der EBV-Erstinfektion. Der Infektionszeitpunkt wird durch den Pfeil markiert (Neumeister u.a., Mikrobiologische Diagnostik © 2009 Georg Thieme Verlag KG, S. 778).



**Abb. 7:** Der Verlauf der Antikörper während einer serologischen Reaktivierung (Neumeister u. a., Mikrobiologische Diagnostik © 2009 Georg Thieme Verlag KG, S. 778).



**Abb. 8:** Ablauf- bzw. Interpretationsschema einer immunoglobulin-klassenorientierten Diagnostik (Neumeister u. a., Mikrobiologische Diagnostik © 2009 Georg Thieme Verlag KG, S. 778).

Bei EBV-assoziierten Erkrankungen kann das Virus in den infizierten Zellen mittels *in situ* Hybridisierung oder Immunhistochemie nachgewiesen werden. Bei Immundefizienten dominiert zur Diagnostik der Erregerdirektnachweis mittels PCR (*polymerase chain reaction*), da eine Antikörperbildung gering ist. Bei Nachweis einer hohen EBV-Last im Blut kann bei asymptomatischen Patienten eine frühzeitige Therapie erfolgen.

### 1.1.5 Therapie

Die Therapie der infektiösen Mononukleose wird symptomatisch durchgeführt. Bei einer komplizierten Infektion mit massiver Tonsillenvergrößerung, hämolytischer Anämie oder ZNS-Beteiligung sind Glucocorticoide für kurze Zeit zur Dämpfung der Immunantwort indiziert. Eine Behandlung mit Antibiotika, insbesondere mit Amoxicillin, sollte aufgrund einer Entstehung eines generalisierten Exanthem unterlassen werden.

Bei EBV-assoziierten Tumoren oder Autoimmunerkrankungen richtet sich die Therapie nach der jeweiligen Erkrankung.

## 1.2 Das Nasopharynxkarzinom (NPC)

Das Nasopharynxkarzinom gehört zu der Gruppe der Kopf-Hals-Tumoren epithelialen Ursprungs und ist auch mit etwa 70% der häufigste maligne Tumor im Bereich des Pharynx bei pädiatrischen Patienten.

### 1.2.1 Epidemiologie

Das Nasopharynxkarzinom (NPC) ist ein seltener Tumor mit einem Gesamtanteil von 0,2% aller Tumorerkrankungen. In der Kindheit macht das NPC etwa 1% der Malignome aus (Baker S.D. et al., 1981). Die Inzidenz in Europa und Nordamerika beträgt etwa 0,5 bis 1 auf 100.000 Kinder und Jugendliche. Allerdings zeigt der Tumor in einigen Regionen der Welt wie in Südostasien und Nordafrika eine erhöhte Inzidenz von 30 auf 100.000 (Dellian M. et al., 2003). Männer sind doppelt bis dreifach so häufig betroffen wie Frauen. Es lassen sich zwei Altersgipfel feststellen: Der erste Altersgipfel liegt zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr und der zweite jenseits des 60. Lebensjahres (Volkes E. et al., 1998; Mould R. et al., 2002).

### 1.2.2 Ätiologie

Als Ursache für die Entstehung des NPC wird neben verschiedenen Umweltfaktoren, Ernährungsgewohnheiten und genetische Faktoren wie z. B. die Assoziation mit HLA-A2, HLA-B17 und HLA-Bw46 eine Infektion der Zellen mit dem Epstein-Barr-Virus gesehen (Vasef M.A. et al., 1997; Volkes E.E. et al., 1997). Vor allem das undifferenzierte NPC, welches schwerpunktmäßig im Kindes- oder Jugendalter auftritt, ist eng mit einer EBV-Infektion assoziiert. Im Tumorgewebe finden sich monoklonale Kopien des EBV-Genomes. CD21 wurde als ein Rezeptor des EBV identifiziert, welcher auf epithelialen Zellen, auf B-Lymphozyten sowie auch auf den Tumorzellen des NPC nachgewiesen werden konnte (Karran L. et al., 1995). Des Weiteren können an einem NPC erkrankten Patienten verschiedene Antikörper gegen das EBV im Serum bestimmt werden, die sich neben der Diagnosesicherung auch zur Verlaufskontrolle eignen.

Der erhöhte Verzehr von gesalzenem Trockenfisch in Asien wurde als Risikofaktor identifiziert, da dies einen relativ hohen Gehalt von kanzerogenen Nitrosaminen aufweist. Nitrosamine können zum Verlust von Tumor-Suppressor-Genen führen, die eine Veränderung des Genoms und somit eine maligne Transformation zur Folge haben können (Chang E. et al., 2006).

### 1.2.3 Histologie und Klassifikation

Nach der Klassifikation der WHO (World Health Organization) wird das NPC in drei morphologische Typen eingeteilt:

WHO-Typ 1:	Verhornendes gut differenziertes Plattenepithelkarzinom	Anteil ca. 20%
WHO-Typ 2:	Nicht verhornendes Plattenepithelkarzinom	Anteil ca. 30-40%
WHO-Typ 3:	Undifferenziertes oder lymphoepitheliales Karzinom (auch Schmincke-Tumor genannt)	Anteil ca. 40-50%

**Abb. 9:** Histologische Einteilung des NPC nach WHO.

TNM-Klassifikation nach „American Joint Committee“, welche in der unteren Abbildung 10 dargestellt ist:

<b>TNM-Klassifikation des Nasopharynxkarzinoms:</b>	
T1	Tumor auf einen Bezirk des Nasopharynx beschränkt
T2	Tumor beschränkt auf zwei Bezirke
T3	Tumor mit Ausdehnung auf die Nasenhaupthöhle und/oder den Oropharynx
T4	Tumor mit Invasion der Schädelbasis und/oder mit Befall der Hirnnerven
N0	Kein Nachweis für einen Befall regionärer Lymphknoten
N1	Ipsilateraler einzelner Lymphknoten bis max. 3 cm
N2	Ipsilateraler LK 3 - 6 cm oder multiple ipsilaterale LK < 6 cm oder bilaterale LK < 6 cm
N3	Lymphknoten > 6 cm
M0	Kein Nachweis für Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden (Lunge, Knochen, Leber, andere Lokalisation)

**Abb. 10:** TNM-Klassifikation des NPC (Krüger G.R.F. and Wustrow J., 1981).

Je nach Kombination des T-, N- und M-Status erfolgt die Einteilung des NPC nach dem unten abgebildeten Schema:

<b>Stadieneinteilung:</b>		
Stadium I	T1, N0, M0	“Niedriges Risiko”
Stadium II	T2, N0, M0	
Stadium III	T3, N0, M0 oder T1- 3, N1, M0	“Hohes Risiko”
Stadium IV	T4, N0-3, M0 oder T1- 4, N2-N3, M0 oder T1- 4, N0-3, M1	

**Abb. 11:** Stadieneinteilung des NPC.

#### 1.2.4 Symptomatik

NPC wird wegen geringer Frühsymptome häufig erst im späten Stadien diagnostiziert. Bei mehr als der Hälfte der Patienten werden uni- oder bilateral vergrößerte oft schmerzhaft zervikale Lymphknoten festgestellt. Bei der Erstdiagnose liegen häufig regionale Lymphknoten- oder Fernmetastasen vor (Brockmeier S. et al., 2009).

Zu den späten Symptomen des NPC gehören Schwierigkeiten bei der nasalen Atmung mit Nasenblutung, Mundgeruch und rezidivierende Nasennebenhöhleninfektionen, sowie Paukenergüsse bei Infiltration und Verlegung der Tuba auditiva mit Hörminderung. Des Weiteren treten wegen Tubenventilationsstörungen rezidivierende Mittelohrentzündungen auf, die mit Schmerzen und Druckgefühl im Ohr einhergehen. Weiterhin können Kopfschmerzen wegen den Nasennebenhöhleninfektionen oder der Infiltration der Schädelbasis durch den Tumor entstehen. Je nach Infiltration des NPC sind auch Lähmungen v. a. der Hirnnerven III-VI festzustellen. Eine parapharyngeale Ausbreitung des NPC oder lymphogene Metastasen am Foramen jugulare können auch zum Funktionsausfall der kaudal gelegenen Hirnnerven führen (Naumann H. et al., 1992; Lenarz T. et al., 2007).

Weitere Symptome können auftreten, die durch die Fernmetastasen des NPC hervorgerufen werden, betreffend vor allem Knochen, Lunge, Leber und extraregionäre Lymphknoten. Anders als bei den anderen Kopf-Hals-Tumoren treten Fernmetastasen beim NPC häufiger auf (Brockmeier S. et al., 2009).

#### 1.2.5 Diagnostik des NPC

Die transnasale Endoskopie des Nasopharynx stellt bei einem Verdacht auf ein NPC die Standarduntersuchung dar. Hierbei können auch Biopsien entnommen und anschließend histologisch untersucht werden (Chan A. et al., 2002). Weiterhin hat der Einsatz der Endoskopie, insbesondere mit einem Lupenepipharyngoskop, den Vorteil, kleinere, versteckte Primär- oder Rezidivtumoren nachzuweisen. Zudem kann auch die makroskopische Ausdehnung festgestellt werden. Bei zervikaler Lymphknotenmanifestation wird ein repräsentativer Lymphknoten zur histologischen Untersuchung entnommen.

Als eine weitere wichtige Untersuchung dient die Magnetresonanztomographie (MRT), welche die Ausbreitung des Primärtumors und die befallenen ersten Lymphknotenstationen darstellt. Wichtig ist, dass die Magnetresonanztomographie vor einer ausgedehnten Biopsie des Tumors durchgeführt werden sollte, da sonst Einblutungen ins Gewebe Artefakte verursachen können. Generell zählt zur Stagingdiagnostik der Einsatz von Computer- und Magnetresonanztomographie zum

Standardverfahren. Zum Ausschluss pulmonaler Metastasen werden computertomographische Aufnahmen durchgeführt. Abdominelle Metastasen können mittels der Abdomensonographie gut dargestellt werden. Zur Beurteilung ossärer Beteiligung des Tumors wird die Skelettszintigraphie eingesetzt. Weiterhin ist auch die Durchführung einer Positronenemissionstomographie (PET) z. B. vom Hals, Thorax oder auch Abdomen grundsätzlich möglich, die eine weitere Option in der Primärdiagnostik und der Verlaufsbeobachtung des NPC bietet.

Wesentlich ist auch bei der Erstuntersuchung der Patienten eine Blutentnahme, welche neben einer umfassenden Labor- auch die serologische EBV-Diagnostik enthalten sollte (Lenarz T. et al., 2007). Bei der EBV-Serologie sollten folgende Parameter bestimmt werden:

- anti-VCA (*viral capsid antigen*) spezifisches IgG, IgM und IgA
- anti-EA (*early antigen*) spezifisches IgG und IgA
- anti-EBNA (*EBV-encoded nuclear antigen*) spezifisches IgG

Da auch bei intrakranieller Tumordinfiltration die Hypophysenfunktion beeinträchtigt werden kann, sollten vor Therapieeinleitung Hormone der hypothalamisch-hypophysären Achsen bestimmt werden.

## 1.2.6 Therapie

### 1.2.6.1 Operative Therapie

Wegen der zahlreichen filigranen Strukturen der Schädelbasis und frühzeitiger parapharyngealer Infiltration sind die Operationsbedingungen des NPC erschwert. Eine kurative chirurgische Therapie ist meist nicht möglich.

### 1.2.6.2 Radiochemotherapie

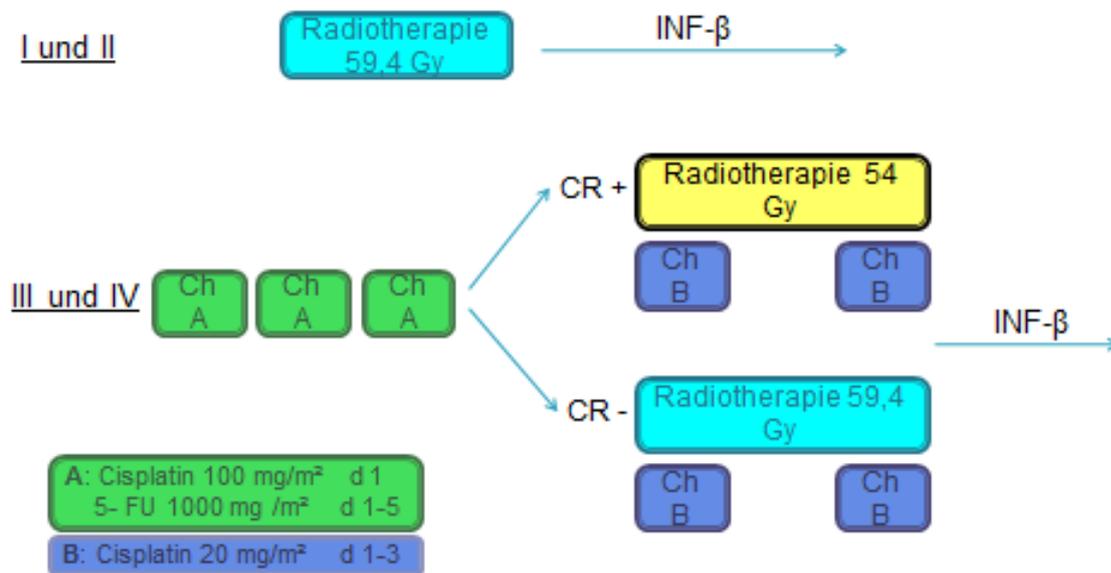
Das NPC zeigt eine hohe Strahlen- bzw. Chemosensibilität (Mould R. and Tai T., 2002; Fischer M. et al., 2001). Vor allem lymphoepitheliale Tumore weisen eine hohe Tumorregressrate unter Radiatio auf (Wannenmacher M et al., 2006; Lenarz T. et al.,

2007). Die Radiochemotherapie des NPC im Kindes- oder Jugendalter richtet sich aktuell nach dem NPC-2003 GPOH-Studienprotokoll.

Die Niedrig-Risiko-Gruppe schließt NPC-Patienten ein, die sich in den Stadien I und II der Erkrankung befinden. Die Therapie dieser Gruppe erfolgt nur durch eine alleinige Radiotherapie mit einer Gesamtstrahlendosis von 59,4 Gy für die primär fassbaren Tumormanifestationen und 45,0 Gy für die jeweiligen Halslymphknoten. Dabei wird die Bestrahlung fünfmal pro Woche mit einer Fraktionierung von 1,8 Gy pro Tag durchgeführt. Nach der Vollendung der Strahlentherapie erhalten die Patienten Interferon (IFN)- $\beta$  (Fiblaferon<sup>®</sup>) intravenös dreimal die Woche über sechs Monate (Buehrlen M. et al., 2012).

Die Patienten, die sich in den Stadien III und IV der Erkrankung befinden, bilden die Hoch-Risiko-Gruppe. Die Behandlung dieser Hoch-Risiko-Gruppe beinhaltet zunächst drei Zyklen neoadjuvante Chemotherapie mit Cisplatin und 5-Fluorouracil gefolgt von Strahlentherapie mit gleichzeitiger Applikation von Cisplatin. Die Gesamtdosis der Strahlentherapie hängt vom Verhalten des NPC unter der neoadjuvanten Chemotherapie ab. Bei Vollremission nach neoadjuvanter Chemotherapie erhalten die Patienten eine reduzierte Gesamtstrahlendosis von 54,0 Gy für die primär fassbaren Tumormanifestationen und 45,0 Gy für die jeweiligen Halslymphknoten. Bei einer nicht kompletten Remission nach neoadjuvanter Chemotherapie beträgt die Gesamtstrahlendosis wie bei der Niedrig-Risiko-Gruppe 59,4 Gy ebenso für die primär fassbaren Tumormanifestationen und 45,0 Gy für die jeweiligen Halslymphknoten. Auch bei dieser Gruppe erfolgt nach der Vollendung der Strahlentherapie eine adjuvante Therapie mit IFN- $\beta$  (Fiblaferon<sup>®</sup>) über sechs Monate intravenös (Buehrlen M. et al., 2012).

# Therapieprotokoll NPC-2003-GPOH



**Abb. 12:** Die Abbildung veranschaulicht das Behandlungsprotokoll für die Studie von 2003 der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (NPC-2003-GPOH). Ch = Chemotherapie; CR+ = Patienten in kompletter Remission; CR- = Patienten in einer nicht kompletten Remission; 5-FU = 5-Fluorouracil (modifizierte Version aus dem Protokoll NPC-2003-GPOH).

## 1.2.7 Prognose

Generell hängt die Prognose von der Histologie, der Ausdehnung sowie der Metastasierung des Nasopharynxkarzinomes ab. Die 5-Jahres-Überlebensraten betragen im Stadium I der Erkrankung um die 85%, im Stadium II etwa 60% und in den Stadien III/IV ca. 40%. Das undifferenzierte oder lymphoepitheliale Karzinom (auch Schmincke-Tumor genannt) hat insgesamt eine bessere Prognose aufgrund seiner hohen Strahlenempfindlichkeit als das verhornende Plattenepithelkarzinom. Hier beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate über 90% (Chan A.T. et al., 2002; Vokes E.E. et al., 2000).

### 1.3 Ziele dieser Arbeit

Das Nasopharynxkarzinom ist eine seltene Erkrankung, insbesondere im Kindesalter. Es besteht eine enge Beziehung zwischen dem Epstein-Barr-Virus (EBV) und der Entwicklung von Nasopharynxkarzinomen. EBV-DNA wird in nahezu allen primären Tumorzellen sowie in den Metastasen nachgewiesen. Bei Vermehrung und Zerstörung des Tumors gelangen die EBV-DNA ins Blut, so dass postuliert werden kann, dass die Konzentration von EBV-DNA im Plasma gut mit der Tumormasse korreliert.

Bekannt ist auch, dass die Bestimmung von EBV-DNA in den PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) und im Vollblut zur Überwachung der pädiatrischen Patienten nach einer allogenen Stammzell- und Organtransplantation geeignet ist (Ruf S. and Wagner H.-J., 2013). Bei pädiatrischen NPC-Patienten ist bisher unbekannt, ob sich die Bestimmung von EBV-DNA in den PBMCs zum Monitoring eignet.

Des Weiteren wurden gezeigt, dass insbesondere bei NPC-Patienten erhöhte Titer von VCA-IgA nachweisbar waren, die wohlmöglich beim Screening zur Früherkennung eines Nasopharynxkarzinoms nützlich sein könnten (Weinreb M. et al., 1996).

Vor diesem Hintergrund waren die Ziele dieser Arbeit die Überprüfung von EBV-DNA im Plasma und in PBMCs sowie die Überprüfung von EBV-Serologien, ob diese sich zur Überwachung des Therapieansprechens während der Chemo- und Strahlentherapie sowie zur Früherkennung eines Rezidives eignen und welche Untersuchung am besten hierfür in der Lage ist.

Fragestellungen:

1. Eignet sich die Bestimmung von Plasma-EBV-DNA zum Monitoring von NPC?
2. Eignet sich die Bestimmung von EBV-DNA in PBMCs zum Monitoring von NPC?
3. Eignet sich die Bestimmung der EBV-Serologie zum Monitoring von NPC?
4. Welche Bestimmungsmethode eignet sich am besten bei mehreren positiven Ergebnissen?

## **2. PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Patienten**

#### 2.1.1 Nasopharynxkarzinom-Patienten

Insgesamt wurden 174 Blutproben von 46 Patienten mit Nasopharynxkarzinom (NPC) untersucht. 87% der Patienten stammen aus der Bundesrepublik Deutschland, 13% aus Österreich, Dänemark und Holland. Hierbei handelte es sich um Kinder und Jugendliche mit einer Altersverteilung von 8 bis 39 Jahren (Median von 15 Jahren). Das Geschlechtsverhältnis von Mädchen zu Jungen beträgt etwa 1:3 mit 11 weiblichen und 35 männlichen Patienten. 38 Patienten waren in der Studie NPC-2003-GPOH (Nasopharynxkarzinom-Gesellschaft für pädiatrische Hämatologie und Onkologie) registriert. Von den übrigen acht Patienten wurden sechs nicht in Deutschland behandelt und waren deswegen nicht registriert. Die verbliebenen zwei Patienten konnten in die obige Studie nicht eingeschlossen werden, da sie wegen ihres hohen Alters (jeweils 39 Jahre) die Einschlusskriterien nicht erfüllten. Diese nicht in die obige Studie eingeschlossenen acht Patienten wurden allerdings analog zu dem Studienprotokoll behandelt.

44 von 46 Patienten gehörten der Hoch-Risiko-Gruppe an, wobei bei sieben Patienten ein Stadium III und bei 37 Patienten ein Stadium IV diagnostiziert wurde. Nur ein Patient wurde der Niedrig-Risiko-Gruppe zugeordnet, bei dem ein Stadium II der Erkrankung festgestellt wurde. Bei einem Patienten blieb das Stadium bei Erstdiagnose unbekannt. Vier von 46 Patienten erlitten ein Rezidiv des Nasopharynxkarzinoms.

#### 2.1.2 Kontrollgruppe

Die Voraussetzung für die Aufnahme in die Kontrollgruppe war, dass die Kinder und Jugendliche frei von einer hämatologischen als auch von einer onkologischen Erkrankung wie u. a. Nasopharynxkarzinom waren. Hierbei diente eine Gruppe von 75 stationären pädiatrischen Patienten der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Medizinischen Universität zu Lübeck. Die Altersspannweite reichte von 7 bis 19 Jahren mit einem Median von 14 Jahren. Die Geschlechterverteilung von Mädchen zu Jungen betrug etwa 1:1,1 mit 35 Mädchen und 40 Jungen.

Die nachfolgende Abbildung 13 stellt die Eigenschaften der verschiedenen Gruppen in tabellarischer Form dar.

<u>Eigenschaften der NPC-Patienten</u>	<u>Werte</u>	<u>Eigenschaften der Kontrollgruppe</u>	<u>Werte</u>
<b>Gesamtanzahl</b>	46	<b>Gesamtanzahl</b>	75
<b>Alter (in Jahren)</b>		<b>Alter (in Jahren)</b>	
Median	15	Median	14
Spannweite	8 - 39	Spannweite	7 - 19
<b>Geschlechtsverteilung, absolut (relativ)</b>		<b>Geschlechtsverteilung, absolut (relativ)</b>	
Männlich	35 (76,1%)	Männlich	40 (53,3%)
Weiblich	11 (23,9%)	Weiblich	35 (46,7%)
<b>Anzahl der NPC-Patienten in jeweiliger Stadieneinteilung, absolut (relativ)</b>			
Typ I nach WHO-Klassifikation	0 (0)		
Typ II nach WHO-Klassifikation	1 (2,2%)		
Typ III nach WHO-Klassifikation	7 (15,2%)		
Typ IV nach WHO-Klassifikation	37 (80,4%)		
Stadieneinteilung unbekannt	1 (2,2%)		
<b>Anzahl der NPC-Patienten mit einem Rezidiv, absolut (relativ)</b>	4 (8,7%)		
<b>Anzahl der NPC-Patienten, die eine Therapie gemäß dem NPC-2003-GPOH-Studienprotokoll erhalten haben, absolut (relativ)</b>	46 (100%)		
– davon in der Studie registriert, absolut (relativ)	38 (80,6%)		

**Abb. 13:** Tabellarischer Übersicht der Eigenschaften von NPC-Patienten- und der Kontrollgruppe.

## 2.2 Material und Methoden

### 2.2.1 Überblick zum Versuchsablauf

Zuerst gewinnt man aus dem Vollblut mittels Zentrifugation Plasma und durch eine Dichtezentrifugation mittels Ficoll-Separationslösung mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs). Danach erfolgt die Isolation von DNA (*deoxyribonucleic acid*) aus dem Plasma und den PBMCs mithilfe eines Säulenextraktionsverfahrens. Die DNA-Konzentration des PBMC-Eluates wird spektralphotometrisch gemessen. Zur Detektion und Quantifizierung der in den Plasma- und PBMC-Proben enthaltenen EBV-spezifische Sequenzen erfolgt eine quantitative Polymerasekettenreaktion in Echtzeit durch das ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (SDS). Anschließend erfolgt die Auswertung und Quantifizierung der Ergebnisse am Computer. Ein weiterer Schritt bestand darin, die EBV-Serologie im Plasma zu bestimmen. Hierfür wurde ein ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)-Reader verwendet, und die Immunglobuline (Ig) G, M und A gegen EA (*early antigen*) sowie IgG gegen EBNA (*EBV-encoded nuclear antigen*)-1 von EBV bestimmt.

### 2.2.2 Probengewinnung

Für die Untersuchungen werden 5-10 ml ungekühltes EDTA-Blut der NPC-Patienten verwendet. Die Proben werden nach Ankunft per Post umgehend weiterverarbeitet, damit keine Fehlbestimmungen durch zu lange Lagerung der Proben entstehen. Aus dem Vollblut werden Plasma und PBMCs gewonnen und diese danach eingefroren, um dann mit den weiteren Schritten fortzufahren.

Zur Gewinnung des Plasmas und der PBMCs wird das Blut in einer Zentrifuge bei 1.200 rpm für 8 min zentrifugiert. Hierbei kommt es zu einer Schichtung des vorher einheitlichen roten Blutes. Aus der gelblich-durchsichtigen oberen Plasmasäule wird das Plasma abpipettiert und zu 500 µl großen Portionen bei -20 °C weggefroren.

Für die Isolation der PBMCs wird eine Ficoll-Separationslösung (Ficoll Separation Solution, Biochrom, Berlin) zu Hilfe genommen. Hierbei handelt es sich um ein synthetisch hergestelltes Polysaccharid aus Saccharose und Epichlorhydrin, welches stark verzweigt sowie gut wasserlöslich ist und somit sich gut zur Dichtezentrifugation

eignet. Das Probenmaterial nach Plasmaentnahme wird hierfür mit gleicher Menge PBS (*phosphat buffered saline*) aufgefüllt und erneut durchmischt und dann vorsichtig in ein neues Röhrchen gegeben, das bereits mit 3 bis 3,5 ml mit der Ficoll-Separationslösung (Lympho Prep) gefüllt ist. Durch Zentrifugieren bei 1.500 rpm für 30 min ohne Bremsung trennen sich das Restplasma und die zellulären Bestandteile, so dass aus den so entstandenen Phasenschichtungen die PBMCs aus dem mittleren Zellring abpipettiert werden können. Das Isolat wird mit PBS gewaschen und erneut bei 1.200 rpm für 8 min zentrifugiert. Die als Pellet auf dem Boden abgesetzten PBMCs werden isoliert und mit etwas PBS bei -20 °C in einem Eppendorfgefäß bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

### 2.2.3 Isolation von DNA

Für die Isolation von DNA aus Plasma und PBMCs wird ein kommerziell erhältliches Kit zur Isolierung verwendet (QIAamp DNA-Blood Mini Kit, QIAGEN). Die Benutzung des Kits erfolgte auf die vom Hersteller empfohlene Weise. Die bereits vorbereiteten, eingefrorenen Proben werden hierzu aufgetaut. Von den Eppendorfgefäßen mit 500 µl Plasma werden nach Durchmischen 200 µl in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die PBMCs-Pellets werden mit 170 µl PBS aufgefüllt. Die jetzt folgende Vorgehensweise ist für Plasma und PBMCs gleich. Zu den 200 µl der Proben wird jeweils 20 µl eine DNA- und RNA-freie Protease (QIAGEN Protease) hinzugegeben und die Proben kurz in einem Vortexer durchmischt, um ein optimales Vermengen der beiden Flüssigkeiten zu erreichen. Danach wird zügig 200 µl Buffer AL (beinhaltet chaotropes Salz) hinzugefügt und das Ganze mit einem Vortexer noch einmal kurz durchmischt. Anschließend erfolgt die Inkubation bei 56 °C für 20 min. Die Salze des Buffers und die Protease bewirken die Lyse der Proben. Zum Lysestopp werden dann 200 µl 100%iges Ethanol zu den Proben gegeben und erneut das Ganze kurz zentrifugiert. Die so entstandenen Ansätze werden auf eine DNA-Bindesäule (QIAamp Mini spin column) übertragen, welche sich in einem Sammelgefäß befindet. Die DNA des Lysates bindet nun an die Membran. Durch den Salzgehalt sowie den pH-Wert des Lysates wird verhindert, dass Proteine sich an die Membran binden können und dadurch die Membran vor Verunreinigungen geschützt. Dieser Ansatz wird für 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der dadurch entstandene Durchfluss wird verworfen und die DNA-Bindesäule in ein neues Sammelröhrchen gesetzt. Es folgten nun 2 Auswaschung mit

speziellen Waschpuffern. Zuerst wird 500 µl Buffer AW1 (beinhaltet chaotropes Salz) auf die DNA-Bindesäule aufgetragen und das Ganze für 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der dabei entstandene Durchfluss wird verworfen. Das Waschprocedere wird nun mit 500 µl Buffer AW2 (beinhaltet Natriumazid) und durch weiteres Zentrifugieren für 3 min wiederholt. Die DNA-Bindesäule wird nun in ein 1,5 ml frisches Eppendorfröhrchen überführt und bei dem PBMC-Substrat auch 100 µl einer Elutionslösung (Buffer AE) hinzugegeben. Anschließend wird das Gemisch bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert und für 1 min bei 8.000 rpm zentrifugiert. So wird die DNA der PBMCs in einem Endvolumen von 100 µl gewonnen. Für das Plasma wird nur 50 µl des Elutionspuffers verwendet und nach Inkubation sowie Zentrifugation wird der gleiche Elutionspuffer erneut verwendet. Es erfolgt dann eine erneute Inkubation und Zentrifugation, so dass ein Endvolumen von 50 µl entsteht.

Die unterschiedlich eingesetzten Elutionspuffervolumina beruhen darauf, dass trotz der geringen Konzentration von DNA im Plasma eine möglichst hohe Konzentration im Eluat erreicht wird. In den 50 µl Endvolumen des Plasmas ist somit eine vierfach höhere Konzentration enthalten als in dem Ausgangsvolumen von 200 µl. Die 100 µl Endvolumen der PBMCs sind im Vergleich zu dem Ausgangswert von 200 µl doppelt konzentriert.

#### 2.2.4 Bestimmung der Konzentration von DNA

Von dem PBMC-Eluat werden die DNA-Konzentration und die Reinheit des Eluates photometrisch bestimmt. Dieses wird an einem mit Wasser geeichten Spektralphotometer bei einer Extinktion von 260-280 nm vorgenommen. Wenn die Konzentration der DNA des PBMC-Eluates über 50 µg/ml liegt, wird diese mit destilliertem Wasser auf 50 µg/ml verdünnt. Anhand des Quotienten aus der Extinktion bei 260 und 280 nm lässt sich die Reinheit bestimmen. Der Wert soll zwischen 1,6 und 1,8 liegen.

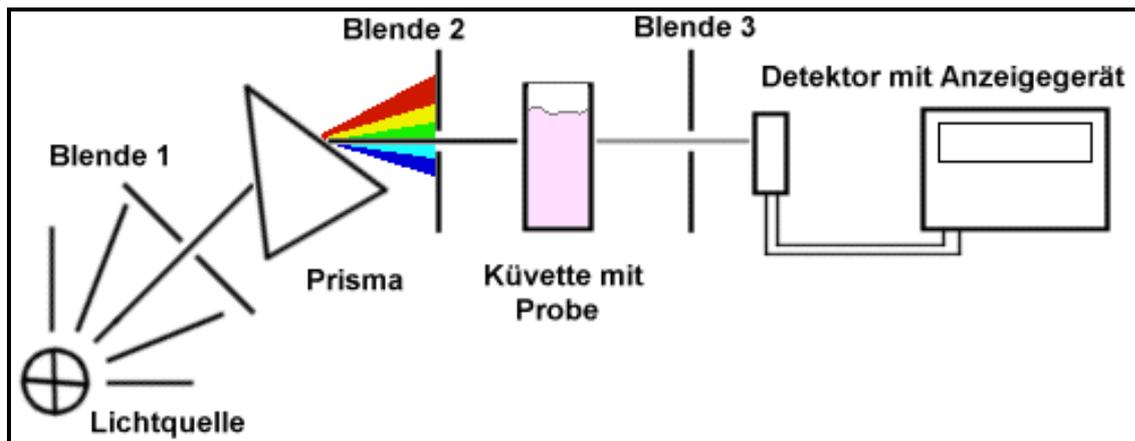


Abb. 14: Prinzip des Spektralphotometers.

## 2.2.5 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion in Echtzeit (real time quantitative polymerase chain reaktion (RQ-PCR))

### 2.2.5.1 Prinzip

Bei der quantitativen Polymerasen-Kettenreaktion in Echtzeit handelt es sich um eine Weiterentwicklung der herkömmlichen Polymerasen-Kettenreaktion (PCR). Durch die PCR kann nahezu jede Nukleinsäuresequenz, die in einer komplexen Probe vorhanden ist, amplifiziert werden. Durch zyklische Prozesse können eine große Anzahl an identischen Kopien von einer bestimmten Sequenz der DNA hergestellt werden, so dass diese weiter analysiert werden können. Bei der herkömmlichen PCR sind nach einer Vervielfältigung des Produktes eine Gelelektrophorese und ggf. auch ein „Southern Blotting“ nötig, um so die Amplifikate zur weiteren Analyse erst sichtbar zu machen. Diese führen auf der einen Seite zum höheren Arbeits- sowie Zeitaufwand und auf der anderen Seite zu dem Problem von Übertragungskontaminationen durch die Arbeitsschritte der post-PCR. Diese Limitation der herkömmlichen PCR wurde durch die quantitative Polymerase-Kettenreaktion in Echtzeit mithilfe der Detektion sequenzspezifischer Fluoreszenzsignale, die im PCR-Reaktionsgefäß während der Zyklen generiert werden, gelöst. Da die Fluoreszenz nahezu proportional zu den neu gebildeten Amplifikaten ist und diese sich quasi pro Lauf verdoppeln, kann im Anschluss die anfänglich in den Proben befindlichen Nukleinsäuresequenz errechnet werden. Durch diese Weiterentwicklung reduzieren sich die Arbeits- und Zeitaufwände sowie auch die Gefahr von Übertragungskontaminationen.

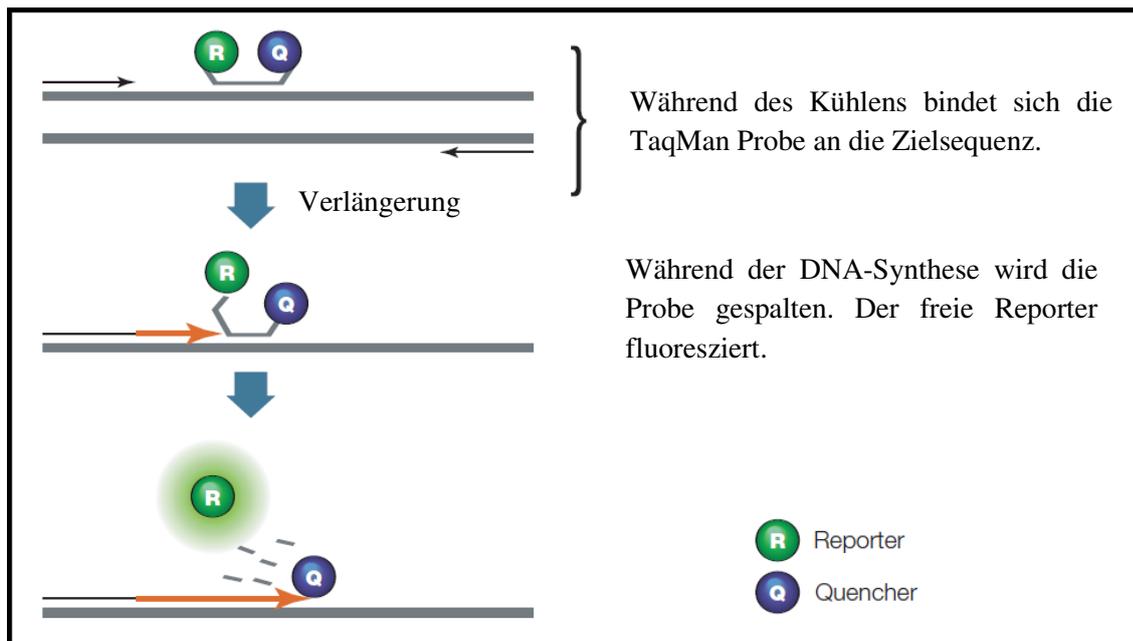
Für die *in vitro* Vervielfältigung definierter Nukleinsäurefragmente durch die TaqMan-Technologie und die TaqMan-Assays werden einige Substanzen, die am Anfang der PCR im Überschuss dazu gegeben werden, benötigt. Dazu gehört die Original-DNA, die den zu vervielfältigenden Abschnitt (*template*) enthält. Des Weiteren werden zwei Primer benötigt. Dabei handelt es sich um einzelsträngige Oligonukleotide. Der Forward-Primer ist komplementär zum 5'-Ende des Plus-Stranges und der Reverse-Primer zum 5'-Ende des Minus-Stranges der DNA. Die Primer legen somit den Startpunkt auf den beiden Einzelsträngen der DNA fest und begrenzen den zu vervielfältigenden Bereich. Weiterhin werden Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), die die Bausteine der DNA-Polymerase zur Bildung eines neuen DNA-Stranges liefern, und thermostabile DNA-Polymerase benötigt. Die DNA-Polymerase entstammt aus einem thermophilen Bakterium (*Thermus aquaticus* (*Taq*)) und ist wegen des natürlichen Vorkommens in Geysiren sowie in heißen Quellen sehr hitzebeständig. Dieses Enzym (Taq-Polymerase) hat ein Temperaturoptimum bei circa 70 °C und ist sogar für eine gewisse Zeit auch bei 95 °C stabil. Die Taq-Polymerase besitzt zudem 5'-3'-Exonukleaseaktivität. Zur optimalen Arbeitsweise benötigt diese Polymerase eine Pufferlösung mit Magnesium-Ionen. Weiterhin werden bestimmte Sonden wie sequenzspezifische Oligonukleotide benötigt. Diese Sonden sind komplementär zu einer bestimmten Sequenz, die zwischen den Bindungsstellen der Primer liegt. Als Besonderheit der RQ-PCR besitzt diese Sonde am 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporterfarbstoff (R) und am 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (Q). Als Reporterfarbstoff wird VIC (4,7,2'-trichloro-7'-phenyl-6-carboxyfluorescein, Fluoreszenzfarbstoff der Firma Applied Biosystems) und FAM (6-carboxy-fluorescein) und als Quencher-Farbstoff TAMRA (6-carboxytetramethyl-rhodamine) verwendet. Diese Sonden können mit den Primern an den Matrizensträngen hybridisieren. Durch Fluoreszenz-Energietransfer (*fluorescence resonance energy transfer* (FRET)) unterdrückt der Quencher-Farbstoff die Fluoreszenzaktivität des Reporterfarbstoffes, solange die Sonde intakt ist und eine räumliche Nähe des Reporters sowie des Quenchers besteht. Wird die Sonde hydrolisiert, kann die Nähe zwischen Quencher-Farbstoff und Reporterfarbstoff nicht mehr aufrechterhalten werden, so dass der Reporter-Farbstoff zu fluoreszieren beginnt. Diese Farbstoffe haben ein Fluoreszenzmissionsmaximum an einer jeweils typischen Wellenlänge:

FAM:  $\lambda_{\max} = 518 \text{ nm}$

VIC:  $\lambda_{\max} = 554 \text{ nm}$

TAMRA:  $\lambda_{\max} = 582 \text{ nm}$

Sowohl in der PCR als auch in der RQ-PCR werden drei Phasen unterschieden. Zuerst wird der zu amplifizierende Doppelstrang *template* in dem Reaktionsgemisch auf 95 °C erhitzt. Bei dieser Temperatur erfolgt die Denaturierung der Doppelstränge. Als nächstes wird der Reaktionsatz auf 60 °C heruntergekühlt, um so das Anlagern der Primer und der Sonden an die Zielsequenz des DNA-Stranges zu ermöglichen. Dieser Schritt wird als Anlagern (*annealing*) bezeichnet. Im letzten Schritt (*extension*) lagert sich die Taq-Polymerase an die DNA an und verlängert durch Anhängen von dNTPs den neu entstehenden Strang (*elongation*). Dies geschieht bei etwa 72 °C. In der Extensionsphase trifft die Taq-Polymerase auch auf die Sonde und beginnt diese zu verdrängen. Hierdurch entsteht eine Y-artige Sekundärstruktur, wodurch aufgrund der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase die Sonde hydrolysiert wird, und es letztendlich zu einem sequenzspezifischen Fluoreszenzsignal kommt. Dieses kann mithilfe des Thermocyclers (ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System) erfasst werden. Der komplette Zyklus kann nun mehrfach wiederholt werden. Das Prinzip der RQ-PCR wird in der folgenden Abbildung 15 dargestellt.



**Abb. 15:** Veranschaulichung des Prinzips der RQ-PCR, nähere Information s. obigen Text (© 2006 Bio-Rad Laboratories, Inc. Real-Time PCR Applications Guide, S. 13).

Die Intensität des Fluoreszenzsignals nimmt entsprechend der Amplifikation der Zielsequenz zu und ist proportional zu der gebildeten Menge an Zielsequenz. Diese Kinetik wird nach jedem Zyklus der PCR aufgezeichnet. Es entsteht so eine Amplifikationskurve mit einer exponentiellen Phase und einer Plateauphase. Die exponentielle Phase beginnt mit dem Überschreiten des Schwellenwertes (*threshold*). Davor gehen die Signale durch die Hintergrundfluoreszenz unter. Der Zyklus, an dem der Schwellenwert (*threshold*) erreicht wird, wird Ct bezeichnet. Die Anzahl der PCR-Zyklen bis zum Erreichen des Schwellenwertes hängt von der ursprünglichen Konzentration des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes ab. Je größer die Anfangskonzentration war, desto weniger PCR-Zyklen werden gebraucht, bis der Schwellenwert erreicht ist. Von verschiedenen Standards, bei denen die DNA-Konzentration bekannt ist, werden die Ct-Werte ermittelt. Diese resultierenden Ct-Werte werden gegen den dekadischen Logarithmus der Startkopienzahl zu Beginn der RQ-PCR aufgezeichnet, so dass eine Standardkurve aus der halblogarithmischen Veranschaulichung erstellt wird. Von dieser Kurve kann schließlich bei bekannten Ct-Werten die zu bestimmende Menge an Ausgangs-DNA-Konzentration in Proben abgelesen werden.

### 2.2.5.2 Assay

Zur Quantifizierung der EBV-Genomlast wird eine RQ-PCR durchgeführt, bei der die hoch konservierte BamHI-K-Region des EBV-Genoms amplifiziert werden kann. Diese Region kodiert für das Gen des EBNA-1. Zusätzlich wird im selben Ansatz eine interne positive Kontrolle mitgeführt. Hierbei handelt es sich um die Region des humanen C-reaktiven Proteins (CRP).

Zur Bestimmung mittels RQ-PCR der EBV-DNA aus dem in vorherigen Schritten gewonnene Plasma und PBMCs werden von jeder Probe Doppelbestimmungen durchgeführt, um Verunreinigungen oder Fehler zu erkennen. Weiterhin wird zusätzlich bei jedem Reaktionsansatz eine Negativkontrolle mitgeführt, in der nur destilliertes Wasser enthalten ist. Zur Positivkontrolle werden Raji-Zellen, eine B-Zelle des humanen Burkitt-Lymphoms, die latente EBV-Genome enthalten, verwendet. Des Weiteren werden Namalwa-Zellen als Standardreihe angelegt (*NAMALWA (ATCC® CRL-1432™)*) Bei diesen Namalwa-Zellen handelt sich um Zellen des Burkitt-Lymphoms mit konstant 2 integrierten EBV-Kopien pro zelluläres Genom. Jeder Reaktionsansatz enthält eine Standardreihe mit 7 Standards aus unterschiedlicher Anzahl von Namalwa-Zellen. Diese 7 Standards bestehen aus  $2^3$ ,  $2^5$ ,  $2^7$ ,  $2^9$ ,  $2^{11}$ ,  $2^{13}$  und  $2^{15}$  Namalwa-Zellen. Sowohl die Negativ- und Positivkontrollen als auch die Standardreihen werden in jedem Reaktionsansatz doppelt bestimmt.

Für den Reaktionsansatz wird ein „Universal Master Mix“, bestehend aus Taq-Polymerase, die dNTPs, Magnesium und Puffer, eingesetzt. Zudem werden *forward*- und *reverse*-Primer der EBNA-1-DNA benutzt. *CRP-forward*- und *CRP-reverse*-Primer werden für die interne Kontrolle verwendet. Als Sonden werden folgende mit Farbstoff gekoppelten Sonden verwendet:

- Sonde für die BamHI-K-Region des EBV-Genoms, welche EBNA-1 kodiert, mit VIC (*4,7,2'-trichloro-7'-phenyl-6-carboxyfluorescein*) als Reporterfarbstoff
- Sonde für die CRP-Region mit FAM (*6-carboxy-fluorescein*) als Reporterfarbstoff

Dieser Reaktionsansatz wird dann jeweils zu den Proben der Patienten, der Positiv- und Negativkontrolle sowie der Standardreihe hinzugefügt. Anschließend werden die einzelnen Ansätze jeweils in doppelter Ausführung in einer 96-well Reaktionsplatte

überführt und mittels einer RQ-PCR (Thermocycler ABI PRISM<sup>®</sup> 7700 Sequence Detection System) ausgewertet.

## 2.2.6 EBV-Serodiagnostik

### 2.2.6.1 Serologie

Für die Analyse des serologischen Status der Patienten und der Kontrollpersonen wird ein ELISA (*enzym-linked immunosorbent assay*) eingesetzt. Zum einen werden die Immunglobuline (Ig) G, A und M gegen EA des EBV und zum anderen das IgG gegen EBNA-1 eingesetzt. Bei einer frischen EBV-Infektion steigt zuerst VCA-IgM an. Kurze Zeit später nimmt die Konzentration von VCA-IgM ab und die von VCA-IgG zu, welche dann lebenslang nachweisbar ist. Etwa zeitgleich mit VCA-IgM steigt auch EA-IgM im Serum an, das einen ähnlichen Verlauf zeigt. Anschließend kommt es aufgrund der Serokonversion zu einem Anstieg des EA-IgG und als Zeichen der Epithelbeteiligung zum Anstieg des EA-IgA. Im weiteren postinfektiösen Verlauf nimmt die Konzentration dieser Antikörper ab und es kommt zu einem Anstieg des EBNA-1-IgG. Etwa im ersten Monat nach Krankheitsbeginn ist EBNA-1-IgG meist negativ, jedoch positiv nach einer durchgemachten oder reaktivierten Infektion. Somit kann eine primäre EBV-Infektion serologisch durch Nachweis EA-IgM bzw. -IgG und VCA-IgM bzw. -IgG sowie durch das Fehlen von EBNA-1-IgG diagnostiziert werden. Eine latente oder länger zurückliegende EBV-Infektion zeigt der alleinige Nachweis von EBNA-1-IgG. Gleichzeitiger Nachweis von EBNA-1-IgG und VCA-IgM kann auf eine Reaktivierung hindeuten (Abschnitt 1.1.4, Abbildungen 6 und 7).

### 2.2.6.2 ELISA zur Bestimmung von EBV-spezifischen Antikörpern

Die benötigten Substanzen werden vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmt sowie durchmischt und der zehnfach konzentrierte Waschpuffer mit destilliertem Wasser in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt. Danach werden die Plasmaproben der Patienten weiter mit Probenpuffer in einem Verhältnis von 1:101 verdünnt und anschließend mit dem Vortexer durchmischt.

Für den Nachweis von EA-IgA in den Plasmaproben wird ein Assay von EUROIMMUN (Medizinische Labordiagnostik AG, Lübeck) benutzt. Dieser dient der quantitativen Bestimmung humaner Antikörper der Klasse IgA gegen EBV EA-D (*EBV early antigen-diffuse*). In den mit rekombinantem EBV EA-D-p54 beschichteten Vertiefungen der einzelnen Näpfchen der Mikrotiterplatte werden Plasmaproben der Patienten pipetiert, so dass Antigen-Antikörper-Komplexe mit denen in den Plasmaproben enthaltenen EA-IgA und dem rekombinanten EBV EA-D-p54 entstehen können. Insgesamt wird dieses Gemisch für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal mit einem PBS-Puffer gewaschen. Zum vollständigen Entfernen von Waschpufferresten sowie von nicht gebundenen Antikörpern wird dann jeweils am Ende des Waschvorganges die Mikrotiterplatte mit der Öffnung nach unten auf Fließpapier ausgeschlagen. Die nicht entfernte Flüssigkeit in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte nach dem Waschvorgang kann zu falsch niedrigen Extinktionswerten führen. Falsch hohe Extinktionswerte können durch unzureichenden Waschvorgang, zu geringen Waschvolumina oder auch zu geringer Einwirkzeit des Waschpuffers entstehen.

Zur Darstellung dieser Antigen-Antikörper-Komplexe wird in einem zweiten Schritt in das obige Gemisch eine Suspension mit einem sekundären Antikörper (Peroxidase-konjugiertes anti-Human-IgA) gegen EA-IgA hinzugefügt und für weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert sowie erneut gewaschen, um die nicht gebundenen sekundären Antikörper zu entfernen.

Danach wird das Substrat TMB (*3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine*) hinzu pipetiert und für 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Das Substrat kann nun durch das Enzym Peroxidase katalysiert werden, so dass auf diese Weise das Gemisch in eine blaue Farbe umschlägt. In der gleichen Reihenfolge und Geschwindigkeit, in der das Substrat in die einzelnen Vertiefungen pipetiert wird, wird eine Stopplösung - bestehend aus Schwefelsäure - zum Beenden der Enzymreaktion hinzugefügt, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb ausgelöst wird. Zur Gewährleistung der homogenen Verteilung der Farblösung in den Vertiefungen wird die Mikrotiterplatte vorsichtig geschüttelt und anschließend die Farbintensität des entstandenen Enzymproduktes photometrisch gemessen. Dies erfolgt bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge bei 620 nm. Zeitgleich werden sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen durchgeführt. Diese Versuchsdurchführung wird zur Steigerung

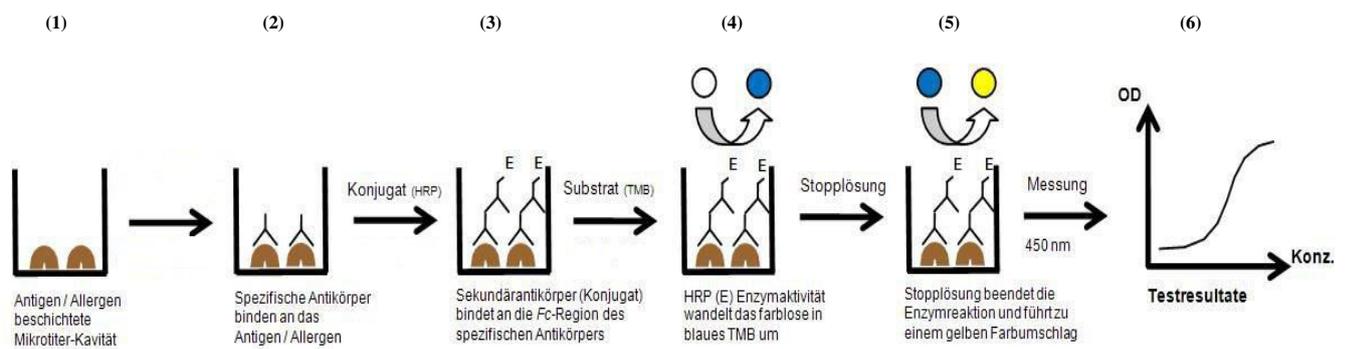
der Zuverlässigkeit doppelt angelegt. Der Kalibrator wird auf dem von EUROIMMUN empfohlenen Grenzwert des Referenzbereiches für nicht infizierte Personen (Cut-off) geeicht.

Voraussetzung zur Auswertung der Ergebnisse sind sowohl positive Ergebnisse aus den Positivkontrollen als auch negative Ergebnisse aus den Negativkontrollen. Da für den Nachweis der Antikörper der Klasse IgA gegen EBV EA-D kein internationales Referenzserum existiert, werden die Ergebnisse der Patientenproben semi-quantitativ in Form von einem Ratiowert gegenüber dem Kalibrator und als ein relatives Maß für die Konzentration der Antikörper im Serum angegeben. Bei einer Ratio von  $\geq 1,0$  werden die Proben als positiv und  $< 1,0$  als negativ bewertet. Da die Bestimmung von Antikörpern in den Proben der Patientenseren erfolgt, wird für die Ermittlung der Ratio der Mittelwert verwendet.

Für den Nachweis von EA-IgM, EA-IgG und EBNA-1-IgG wird das ELISA von Biotest aus Dreieich verwendet. Dieser Ablauf hierzu unterscheidet sich minimal von der bereits oben beschriebenen Versuchsdurchführung. Zum Nachweis von IgG in den Plasmaproben der Patienten gegen EBNA-1 wird das rekombinante EBNA-1-p72 verwendet. Mithilfe von rekombinanten EA-p54 oder -p138 können auch EA-IgM und -IgG in den Plasmaproben mittels ELISA bestimmt werden.

Vor Verwendung der Substanzen wird auch diese auf Raumtemperatur gebracht und durchmischt. Die Patientenplasmaproben, die Positiv- und Negativkontrolle wird mit einem Verdünnungspuffer jeweils in einem Verhältnis von 1:21 vorverdünnt. Auch hier werden die Versuche doppelt bestimmt. Die Versuchansätze werden insgesamt für 30 min bei 37 °C inkubiert. Lediglich bei dem Versuchsansatz von EA-IgM erfolgt diese Inkubation für 60 min. Nach einem fünfmaligen Waschvorgang mit einem Waschpuffer werden Peroxidase-konjugiertes anti-Human-IgG bzw. Peroxidase-konjugiertes anti-Human-IgM hinzugefügt, erneut bei 37 °C für 30 min inkubiert und im Anschluss erneut fünfmal gewaschen. Nun erfolgt die Hinzugabe vom Substrat TMB und eine weitere Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur für 30 min. Anschließend wird die Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) als Stopplösung hinzu pipettiert und die Absorption wird bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge gemessen.

Für die Auswertung nach der Messung der Extinktion wird zuerst der Mittelwert des Blankwertes ermittelt, welcher nur aus dem Verdünnungspuffer besteht, und von den Kontrollenproben sowie den Proben der Patienten abgezogen. Um die Proben verwerten zu können, muss der OD (optische Dichte)-Mittelwert der Negativkontrolle  $\leq 0,200$  und der Positivkontrolle  $\geq 0,800$  sein. Der Cut-off-Wert berechnet sich aus dem Mittelwert der optischen Dichte der Negativkontrolle und eine Addition von 0,200 zu dem errechneten Mittelwert. Die Grauzone liegt für die Bestimmung von EBNA-1-IgG zwischen dem Cut-off-Wert und 80% des Cut-off-Wertes. Für die Bestimmung von EA-IgG und EA-IgM beträgt der Graubereich zwischen dem Cut-off-Wert und 90% des Cut-off-Wertes. Proben mit einer Extinktion unterhalb der Grauzone werden als negativ und oberhalb oder gleich des Cut-off-Wertes als positiv gewertet.



**Abb. 16:** Prinzip der einfachen Sandwich-Methode des ELISA. Nach Zugabe der mit den Antikörper enthaltenen Probe binden die spezifischen Antikörper an die mikrotiterhaftenden Antigene (2). Nach Entfernung des Überstandes und Waschung des Versuchansatzes, um die unspezifischen Antikörper zu entfernen, werden anschließend mit Peroxidase-gekoppelter sekundäre Antikörper, die an das Antigen der primären Antikörper gerichtet sind, hinzugefügt (3). Nach Hinzugabe des Farbstoffes TMB wird der Farbstoff enzymatisch von der Peroxidase gespalten, wodurch der blaue Farbton entsteht (4). Nun wird eine Stopplösung (Schwefelsäure) nach einer bestimmten Zeit beigemischt, um die Enzymreaktion zu stoppen, damit gleiche Ergebnisse erzielt werden können. Hierdurch erfährt die Lösung einen Farbumschlag von blau nach gelb, welcher dann photometrisch gemessen wird (5). Die Farbintensität ist proportional zur Menge des gebundenen Zielmoleküls. Nun kann anhand einer Kalibrationskurve die Konzentration des nachzuweisenden Antigens erfasst werden (6) (© 2011 Immunolab GmbH, Specialists in Immunodiagnostics, Kassel, Germany).

### **3. ERGEBNISSE**

#### **3.1 Serologien**

Mithilfe der serologischen Diagnostik wird die EBV-Primärinfektion von Seronegativen und abgelaufenen EBV-Infektionen beim Immungesunden differenziert. Dabei zeigen VCA-IgM und EA-IgM eine frische EBV-Infektion an. Später werden VCA-IgG und EBNA-1-IgG gebildet. Die gleichzeitige Aktivierung von VCA-IgM sowie EBNA-1-IgG deutet entsprechend auf eine Reaktivierung einer latenten EBV-Infektion hin. Nun stellte sich die Frage, ob sich die Antikörper gegen EBV zur Überwachung der Therapie beim NPC sowie zum Erkennen eines NPC-Rezidivs eignen. Obwohl die serologische Untersuchung von EBV für die Unterstützung bei der Diagnose von NPC eingesetzt wird, wurde bisher die zeitliche Kinetik der Antikörperspiegel während und nach der Behandlung nur selten zeitnah untersucht. Bisher konnte gezeigt werden, dass Rezidiv-Patienten ein Jahr nach Abschluss der Strahlentherapie signifikant erhöhte EA-IgG-, insbesondere EA-IgA-Titer hatten (de-Vathaire et al., 1988). Weiterhin wurde festgestellt, dass EBV-Antikörperspiegel ebenfalls mit frühen klinischen Ereignissen der NPC-Patienten nach Behandlung, ähnlich zu den Untersuchungen von EBV-DNA im Plasma, korreliert (Gu A.-D. et al., 2009).

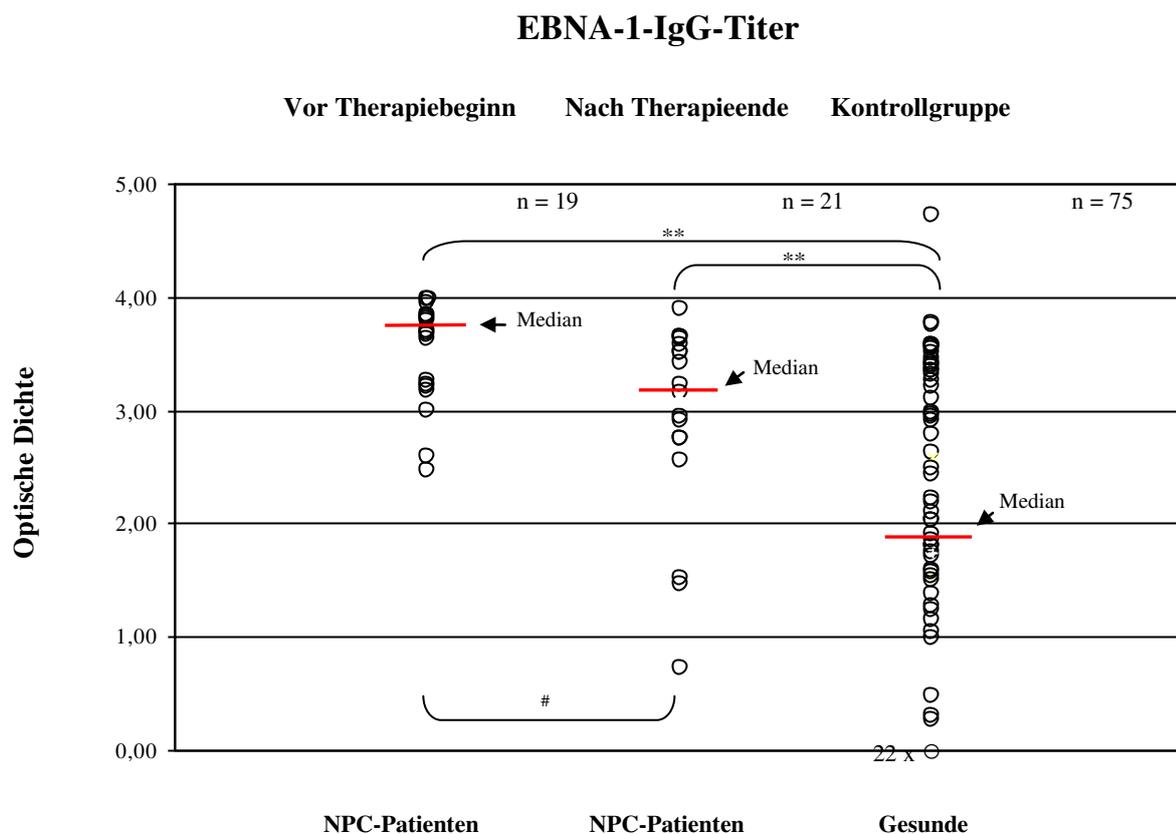
Für die Auswertung der Serologien von EA-IgG, -IgA und -IgM sowie EBNA-1-IgG der NPC-Patienten in kompletter Remission wurden 127 Proben von 41 Patienten, welche zu unterschiedlichen Therapiezeitpunkten abgenommen wurden, untersucht. Von den 41 NPC-Patienten standen zur Auswertung von 19 Patienten Proben vor Therapiebeginn und von 21 Patienten Proben nach Therapieende von EA-IgG, EA-IgA und EA-IgM sowie EBNA-1-IgG zur Verfügung. 16 Proben von drei NPC-Patienten mit einem Rezidiv wurden separat ausgewertet.

Die Kontrollgruppe stellten 75 gesunde Personen dar. Von denen wiesen 53 eine zurückliegende Infektion mit EBV durch einen positiven anti-EBNA-1-IgG-Titer auf. Des Weiteren waren 68 Personen der Kontrollgruppe negativ und sieben positiv auf EA-IgG, 70 Personen negativ und fünf positiv auf EA-IgM sowie 73 Personen negativ und zwei positiv auf EA-IgA.

### 3.1.1 Auswertung der Serologien bei NPC-Patienten in kompletter Remission

#### 3.1.1.1 Bestimmung von EBNA-1-IgG

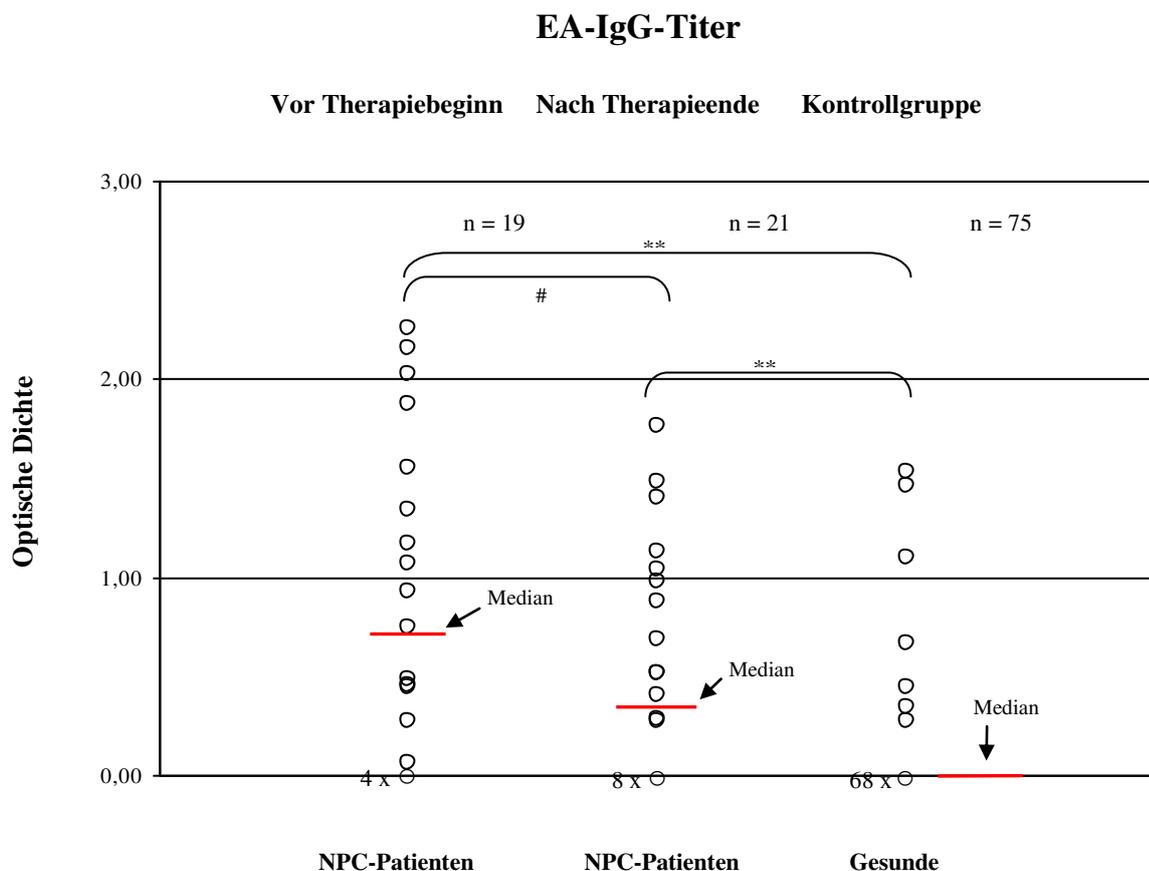
EBNA-1-IgG von Patienten in kompletter Remission wurde vor Therapiebeginn und nach Therapieende bestimmt. Zudem wurde eine Kontrollgruppe gesunder Personen, von denen die meisten zurückliegende EBV-Infektionen aufwiesen, zum Vergleich hinzugezogen. Alle NPC-Patienten sind EBV-seropositiv und weisen als Zeichen einer durchgemachten EBV-Infektion EBNA-1-IgG auf. Die NPC-Patienten weisen höhere Antikörpertiter als Gesunde auf. Nach Therapieende sind diese Antikörper zwar niedriger, allerdings besteht kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu therapienaiven NPC-Patienten. Demnach zeigte sich, dass die Bestimmung der Konzentration von EBNA-1-IgG keine Aussagekraft hinsichtlich des Therapieerfolges hat. Somit lässt sich schlussfolgern, dass die Bestimmung der EBNA-1-IgG-Konzentration allein nicht zur Überwachung des NPC geeignet ist.



**Abb. 17:** Die Bestimmung der Konzentration von EBNA-1-IgG bei den NPC-Patienten vor und nach der Therapie zeigt keinen relevanten Konzentrationsunterschied, so dass die Bestimmung der Konzentration von EBNA-1-IgG zur Überwachung des Therapieerfolges der NPC-Patienten sich nicht eignet (\*\* = signifikanter Unterschied und # = kein signifikanter Unterschied (*parametrischer t-Test*)).

### 3.1.1.2 Bestimmung von EA-IgG

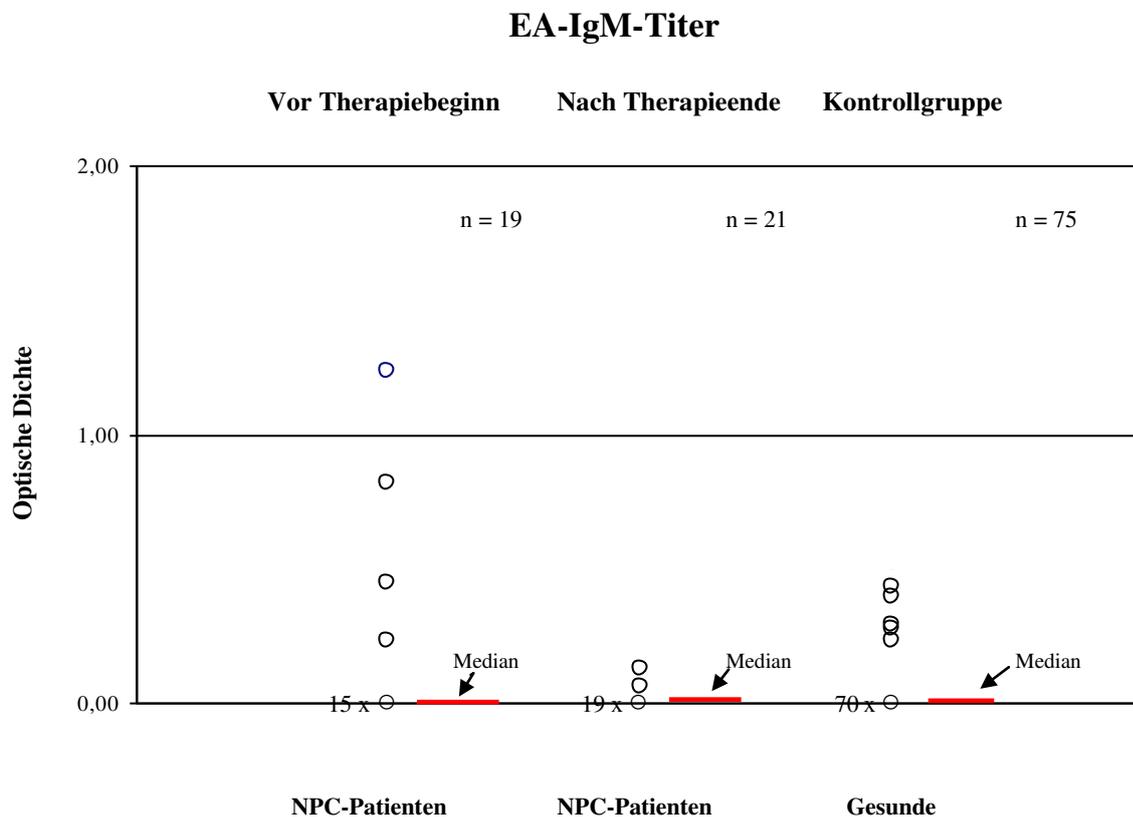
Nachdem gezeigt wurde, dass die Bestimmung von EBNA-1-IgG nicht zum Monitoring des Therapieansprechens geeignet ist, sollte überprüft werden, ob die Bestimmung von EA-IgG zur Überwachung der Therapie geeignet ist. Hierzu wurde EA-IgG von NPC-Patienten, die sich in kompletter Remission nach Abschluss der Therapie befanden, jeweils vor Therapiebeginn und nach Therapieende bestimmt. Auch hier wurde dieselbe Kontrollgruppe zum Vergleich hinzugezogen. 15 von 19 Patienten vor der Therapie und 13 von 21 Patienten nach der Therapie waren positiv gegenüber EA-IgG. Nur bei sieben Kontrollprobanden von 75 war dies der Fall. Die meisten Proben der Kontrollgruppe wiesen keine EA-IgG auf. In den Bestimmungen der Proben vor Therapiebeginn und nach Therapieende waren keine relevanten Konzentrationsunterschiede von EA-IgG erkennbar, so dass auch die Bestimmung der Konzentration von EA-IgG keine Aussagekraft hinsichtlich des Therapieerfolges lieferte. Somit scheint die Bestimmung der EA-IgG-Konzentration nicht zur Überwachung des NPC geeignet zu sein.



**Abb. 18:** Die Bestimmung der Konzentration von EA-IgG bei den NPC-Patienten vor und nach der Therapie stellt keinen signifikanten Konzentrationsunterschied dar, so dass die Bestimmung der Konzentration von EA-IgG zur Überwachung des Therapieerfolges der NPC-Patienten nicht in Frage kommt (\*\* = signifikanter Unterschied und # = kein signifikanter Unterschied (*parametrischer t-Test*)).

### 3.1.1.3 Bestimmung von EA-IgM

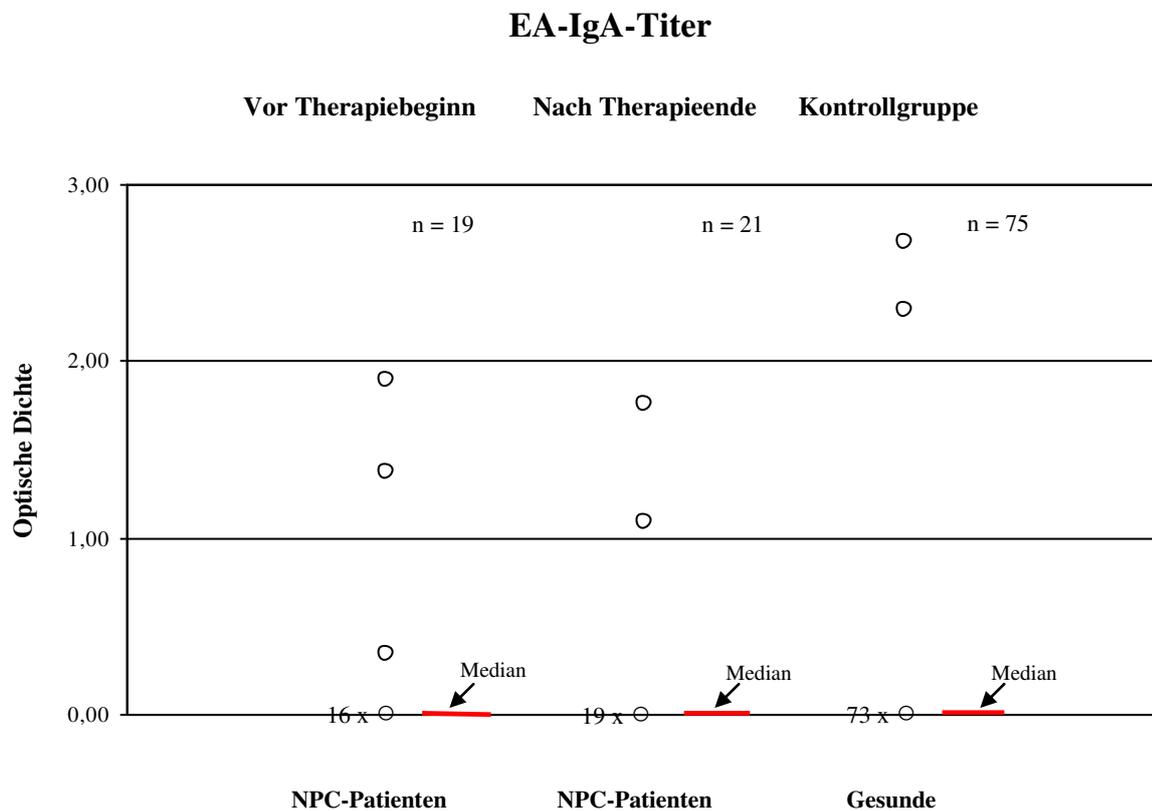
Weiterhin wurde überprüft, wie sich die Bestimmung der Konzentration von EA-IgM während der Therapie verhält. Wie in den Voruntersuchungen wurde EA-IgM in den Proben der NPC-Patienten mit späterer kompletter Remission ebenfalls vor Therapiebeginn und nach Therapieende bestimmt. Dieselbe Kontrollgruppe wurde auch hier zum Vergleich hinzugezogen. Insgesamt konnte festgestellt werden, dass EA-IgM unter der Therapie zwar abfällt, jedoch gibt es kaum einen Unterschied zum Kontrollkollektiv, so dass allein aufgrund dieser Tatsache die Konzentrationsbestimmung von EA-IgM gar nicht zur Überwachung des Therapieansprechens in Frage kommt.



**Abb. 19:** Bei den NPC-Patienten mit späterer kompletter Remission sowie bei den Gesunden lässt sich EA-IgM kaum nachweisen, so dass allein aufgrund dieser Feststellung die Konzentrationsbestimmung von EA-IgM keine Aussagekraft hat.

### 3.1.1.4 Bestimmung von EA-IgA

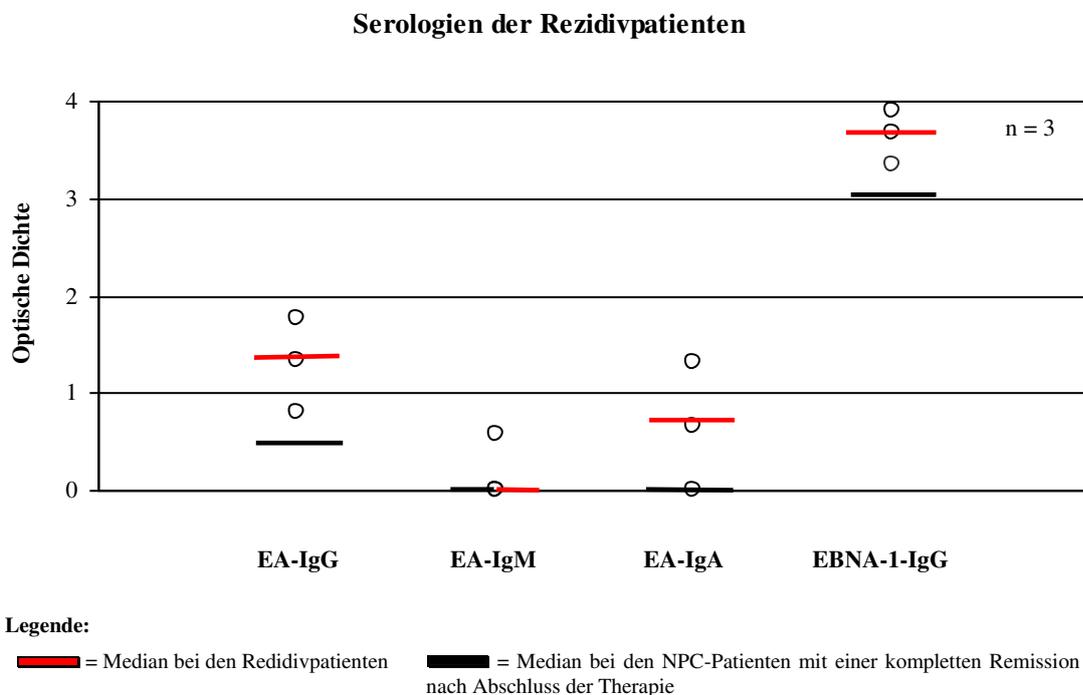
Analog zu den Voruntersuchungen wurde ferner überprüft, ob die Bestimmung der Konzentration von EA-IgA hinsichtlich des Therapieansprechens eine Aussagekraft hat. Ähnlich zu den Voruntersuchungen wurde EA-IgA in den Proben der NPC-Patienten mit späterer kompletter Remission vor Therapiebeginn und nach Therapieende detektiert. Auch hier wurde dieselbe Kontrollgruppe zum Vergleich hinzugezogen. Zwischen den therapie-naiven NPC-Patienten und den NPC-Patienten nach der Behandlung bestand kein Unterschied. Ebenso bestand kein Unterschied zwischen den NPC-Patienten und den Kontrollprobanden. Somit konnte festgehalten werden, dass die Bestimmung der Konzentration von EA-IgA keine aussagekräftige Information liefert.



**Abb. 20:** Ähnlich wie EA-IgM lässt sich EA-IgA kaum bei den NPC-Patienten mit späterer kompletter Remission sowie bei den Gesunden nachweisen, so dass auch die Bestimmung der Konzentration von EA-IgA analog zur Konzentrationsbestimmung von EA-IgM keinerlei Aussage liefert.

### 3.1.2 Auswertung der Serologien bei den NPC-Patienten mit einem Rezidiv

Bisher wurde die Korrelation zwischen dem Therapieansprechen und der Konzentration der obigen Antikörper bei den Patienten mit einer kompletten Remission nach Abschluss der Therapie überprüft. Nun stellte sich die Frage, wie sich die Konzentration der jeweiligen Antikörper bei Auftreten eines NPC-Rezidives verhält. Zur Auswertung von EA-IgG, EA-IgM und EA-IgA sowie EBNA-1-IgG standen insgesamt 16 Proben von drei NPC-Patienten mit einem Rezidiv zur Verfügung. Als Ergebnis stellte sich heraus, dass die Konzentrationen der untersuchten Antikörper bei den Rezidivpatienten ähnlich hoch waren wie die der von den Patienten mit einer kompletten Remission nach Abschluss der Therapie. Es zeigten sich keine besonderen Muster an Antikörperkonstellationen, die auf ein Rezidiv hindeuteten. Allerdings war die Anzahl an Patientenproben wegen der Seltenheit des Rezidivereignisses limitiert. Insgesamt kann aber postuliert werden, dass die Bestimmungen der Konzentration der jeweiligen Antikörper nicht zur Früherkennung eines NPC-Rezidives sowie zur Überwachung des Therapieverlaufs geeignet ist.

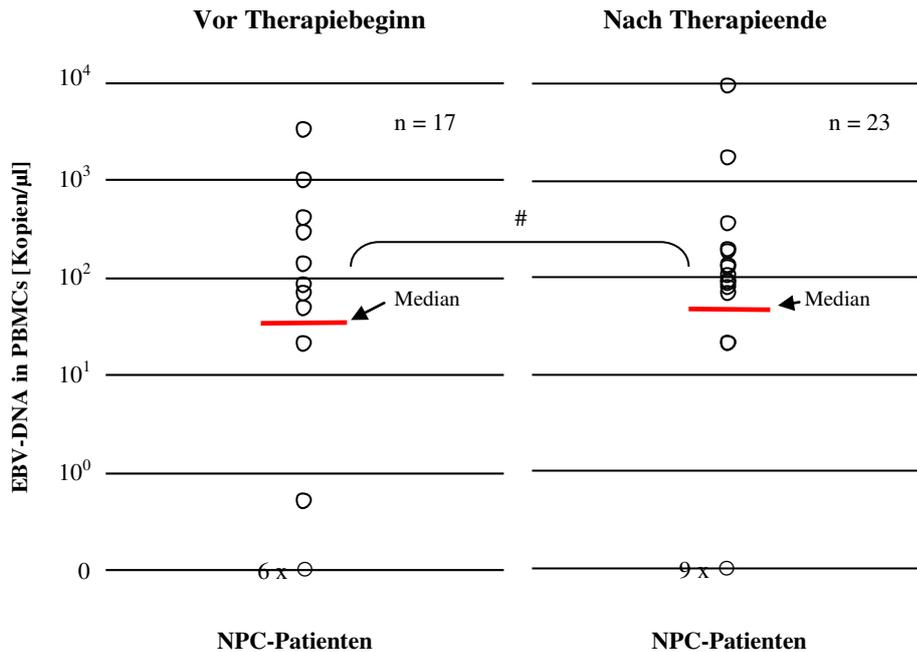


**Abb. 21:** Die Konzentrationsbestimmung der jeweiligen Antikörper bei den Patienten mit einem NPC-Rezidiv zeigt keinerlei signifikanten Unterschied zu den untersuchten Proben der Patienten mit einer kompletten Remission nach Therapieende gemäß dem NPC-2003-GPOH-Studienprotokoll.

### **3.2 Quantifizierung von EBV-DNA in PBMCs**

Zahlreiche Arbeiten belegen, dass die Bestimmung von EBV-DNA in den PBMCs zur Überwachung der pädiatrischen Patienten nach einer allogenen Stammzelltransplantation oder Organtransplantation geeignet ist (Ruf S. and Wagner H.-J., 2013). In dieser Arbeit sollte dementsprechend überprüft werden, ob die Bestimmung von EBV-DNA in den PBMCs auch zur Überwachung der NPC-Patienten im pädiatrischen Kollektiv herangezogen werden kann. Hierzu wurden insgesamt 125 Proben von 38 NPC-Patienten, die eine komplette Remission erlangten, und 17 Proben von vier NPC-Patienten mit einem Rezidiv untersucht. Dabei waren bei den NPC-Patienten in kompletter Remission Proben von 17 Patienten vor Therapiebeginn und von 23 Patienten nach Therapieende verfügbar.

Festgestellt wurde bei den NPC-Patienten in kompletter Remission, dass nur bei zehn der 17 Patienten EBV-DNA in PBMCs vor Therapiebeginn und bei 14 von 23 Patienten nach Therapieende nachweisbar war. Auch die Höhe der EBV-DNA-Last in PBMCs unterschied sich nicht vor und nach Therapie des NPC. Demnach schien die Therapie keinen Einfluss auf die Konzentration von EBV-DNA in PBMCs zu haben (Abb. 22). Bei den Patienten mit einem Rezidiv hatte die Therapie ebenfalls keinen Einfluss auf die Konzentration von EBV-DNA in PBMCs. Somit zeigten sich keine diagnostisch verwertbaren Fluktuationen in der EBV-DNA-Viruslast in PBMCs im Verlauf der NPC-Erkrankung.



**Abb. 22:** Dargestellt sind Konzentrationen von EBV-DNA in PBMCs der NPC-Patienten in kompletter Remission. Es lässt sich feststellen, dass es keinen signifikanten Unterschied der Konzentrationen von EBV-DNA in PBMCs vor und nach Therapie gibt. Demzufolge ist die Messung der Konzentration von EBV-DNA in PBMCs nicht zur Überwachung des NPC geeignet (# = keine Signifikanz (*parametrischer t-Test*)).

### 3.3 Quantifizierung von EBV-DNA im Plasma

Bisher konnte in einigen Arbeiten gezeigt werden, dass eine klinische Bedeutung der Plasmakonzentrationen von EBV-DNA von NPC-Patienten, insbesondere in einem fortgeschrittenen Stadium des NPC, besteht. Jin-Ching et. al. konnten zeigen, dass die Quantifizierung von EBV-DNA im Plasma für die Überwachung von Patienten mit einem NPC sowie für eine Prognose des Erfolges nach einer Therapie geeignet ist (Jin-Ching L. et al., 2004).

In Anlehnung an diese These wurden die Plasmakonzentrationen von EBV-DNA von pädiatrischen NPC-Patienten vor Therapiebeginn und nach Therapieende gemäß dem NPC-2003-GPOH-Studienprotokoll mittels einer RQ-PCR bestimmt.

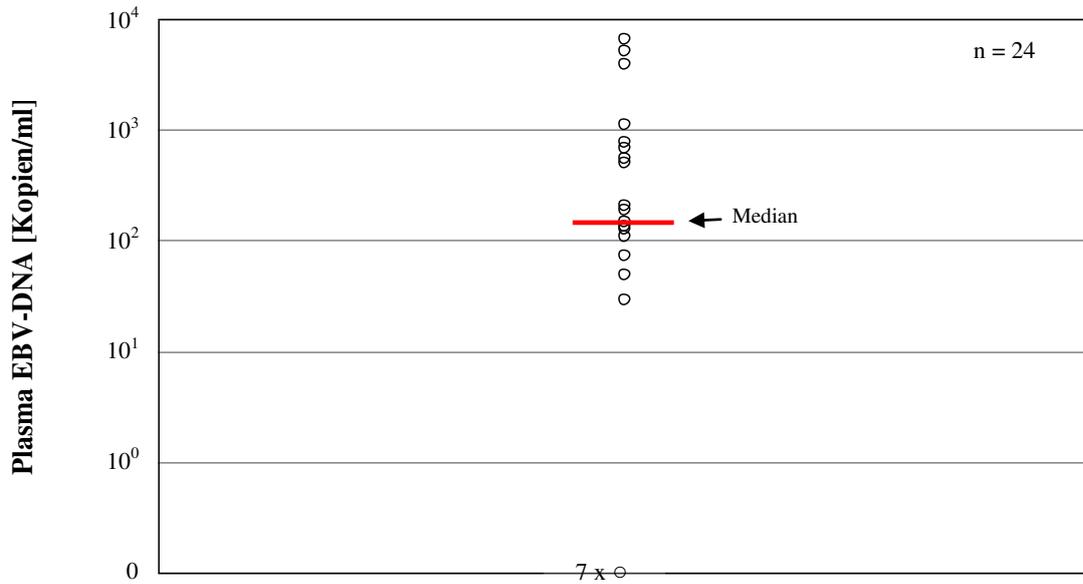
Insgesamt wurden Plasmaproben von 24 der 42 NPC-Patienten in kompletter Remission vor Therapiebeginn untersucht, da von diesen Patienten Plasmaproben vor einer Therapieeinleitung zur Verfügung standen. Die Plasmaproben der vier Patienten, die ein Rezidiv erlitten, wurden separat ausgewertet. In den untersuchten Plasmaproben der 24

NPC-Patienten konnten EBV-DNA im Plasma bei 17 Patienten nachgewiesen werden. Bei den restlichen sieben Patienten ließen sich keine EBV-DNA im Plasma nachweisen. Abbildung 23 zeigt die Plasmakonzentration von EBV-DNA der jeweiligen Patienten vor einer Therapie.

Nach Therapieende gemäß dem NPC-2003-GPOH-Studienprotokoll wurde erneut das Plasma der NPC-Patienten in kompletter Remission auf EBV-DNA untersucht. Analysiert wurden Plasmaproben von 23 der 42 NPC-Patienten, da auch hier nicht von allen Patienten die Plasmaproben nach Therapieende zur Verfügung standen. Es stellte sich heraus, dass sich nur noch bei einem NPC-Patienten EBV-DNA im Plasma nachweisen ließ. Bei den übrigen NPC-Patienten konnten nach Therapieende keine Kopien der EBV-DNA im Plasma detektiert werden. Die nachfolgende Abbildung 24 stellt die Konzentration von EBV-DNA im Plasma nach Therapieende graphisch dar.

Es war somit festzustellen, dass es nach Abschluss einer Therapie gemäß dem NPC-2003-GPOH-Studienprotokoll zu einer Abnahme der Konzentration von EBV-DNA im Plasma kommt. In der Abbildung 25 wurden nur die Plasmaproben von den sieben NPC-Patienten dargestellt, von denen die Plasmaproben vor einer jeweiligen Therapieeinleitung und nach sieben bis zwölf Monaten bzw. zwei bis drei Jahren nach Beendigung der Therapie zur Verfügung standen, um so die Patienten ausschließen zu können, die bereits vor der jeweiligen Therapie keine nachweisbare Konzentration von EBV-DNA im Plasma zeigten. Es wurde festgestellt, dass die Konzentration von EBV-DNA im Plasma nach einer Therapie signifikant abnahm bzw. nicht mehr detektierbar war, was die Hypothese der Reduktion der Konzentration von EBV-DNA im Plasma nach einer Therapie erhärtete.

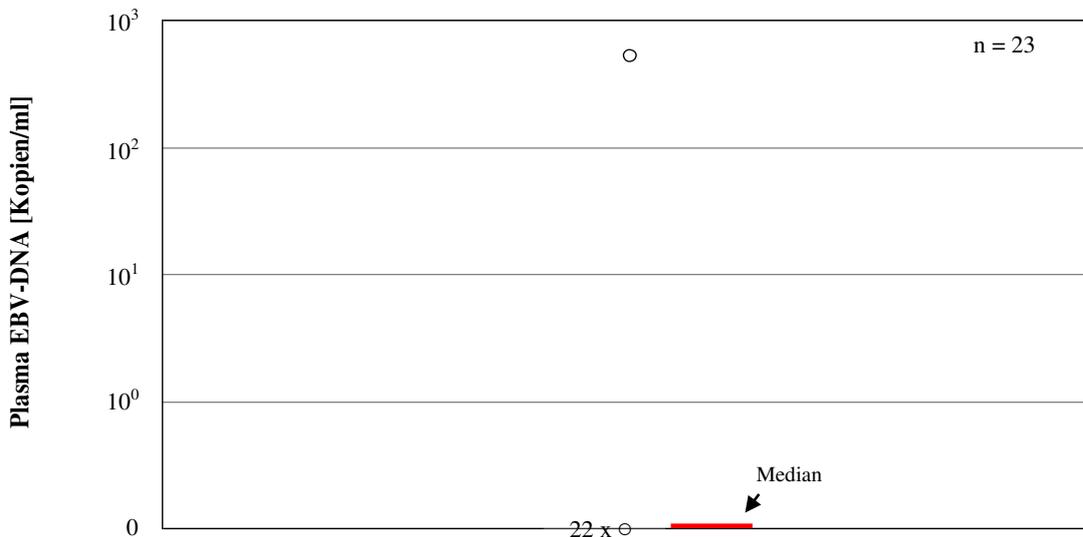
### Vor Therapiebeginn



### NPC-Patienten

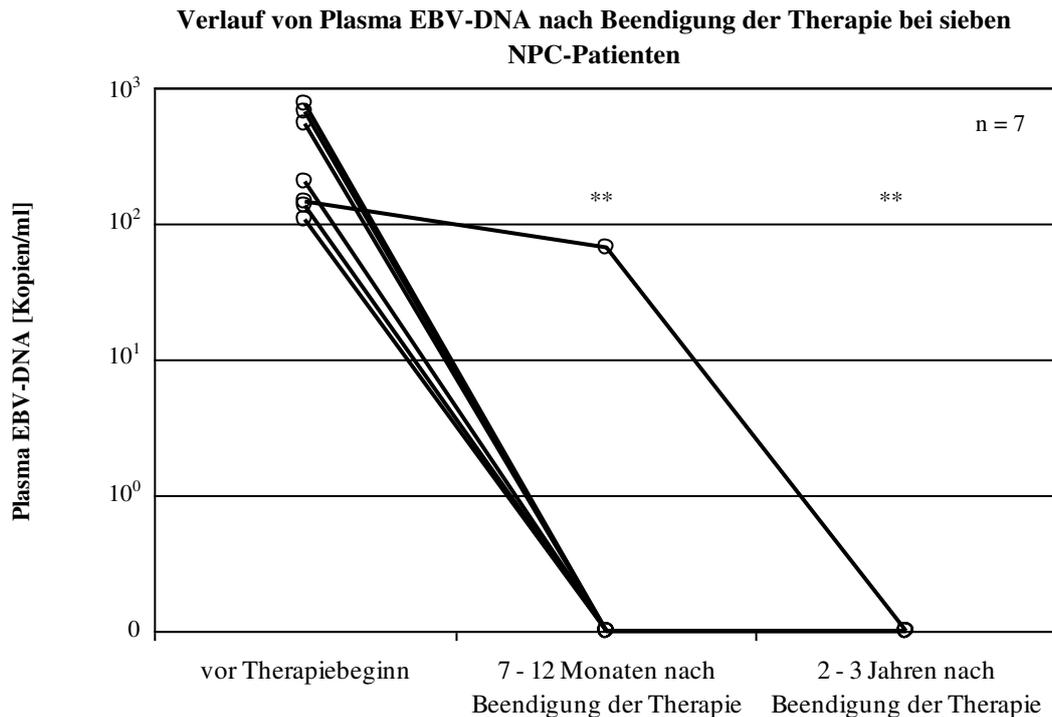
**Abb. 23:** Konzentration der EBV-DNA im Plasma der 24 NPC-Patienten in kompletter Remission. 17 NPC-Patienten zeigten nachweisbare EBV-DNA im Plasma, bei den übrigen NPC-Patienten wurden keine EBV-DNA detektiert (arithmetischer Mittelwert = 837,1 Kopien/ml, Median = 131 Kopien/ml).

### Nach Therapieende



### NPC-Patienten

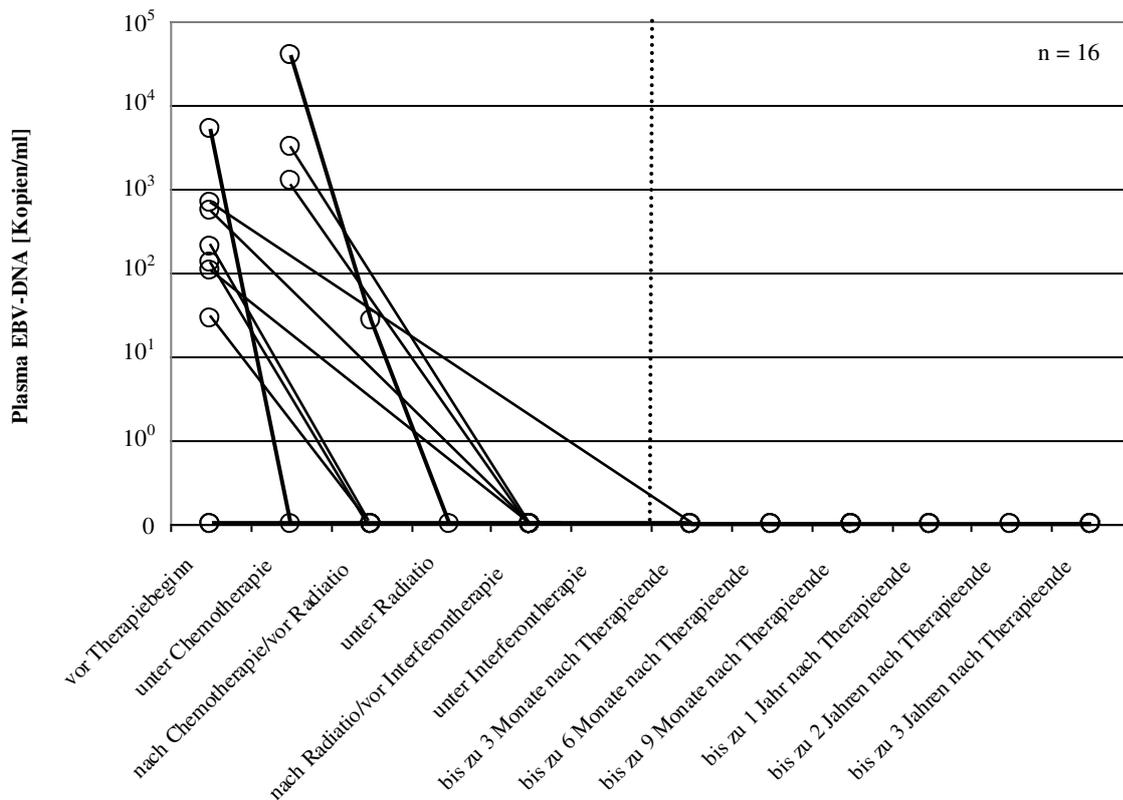
**Abb. 24:** Konzentration der EBV-DNA im Plasma nach Therapieende der 23 NPC-Patienten in kompletter Remission. Nur noch ein Patient zeigt im Plasma nachweisbare EBV-DNA, demnach ist zu folgern, dass es zu einer Abnahme der EBV-DNA im Plasma der NPC-Patienten nach einer Therapie gemäß dem NPC-2003-GPOH-Studienprotokoll kommt (arithmetischer Mittelwert = 32,1 Kopien/ml, Median = 0 Kopien/ml).



**Abb. 25:** Dargestellt sind Konzentrationen von Plasma EBV-DNA der sieben NPC-Patienten in kompletter Remission, bei denen die Plasmaproben jeweils vor Therapiebeginn und nach Therapieende zur Verfügung standen. Es zeigt sich, dass nach einer kompletten Therapie inklusive der Interferontherapie gemäß dem NPC-2003-GPOH-Studienprotokoll die Konzentration von EBV-DNA im Plasma der NPC-Patienten signifikant abnimmt bzw. nicht mehr nachweisbar ist (\*\* = signifikanter Unterschied (*parametrischer t-Test*)).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass es nach Beendigung der Therapie gemäß dem NPC-2003-GPOH-Studienprotokoll bei den meisten der NPC-Patienten keine Kopien von EBV-DNA im Plasma nachweisbar war, sollte nun überprüft werden, wie sich die Konzentration von EBV-DNA im Plasma während der Therapie verhält. Hierzu wurden die Plasmaproben von 16 der 42 NPC-Patienten im Verlauf der Therapie untersucht, da nur bei diesen Patienten Plasmaproben während des Therapieverlaufes zur Verfügung standen. Es zeigte sich, dass die Konzentration von EBV-DNA im Plasma der NPC-Patienten bereits zu Beginn der Therapie abnahm und etwa nach drei Monaten nach Beendigung der Therapie keine Kopien von EBV-DNA mehr nachweisbar waren. Weiterhin wurde festgestellt, dass in den Kontrolluntersuchungen bis zu drei Jahren nach Beendigung der Therapie keine EBV-DNA im Plasma dieser Patienten detektierbar war. NPC-Patienten, die bereits vor der Therapie negativ auf EBV-DNA waren, blieben auch über die ganze Zeitdauer negativ.

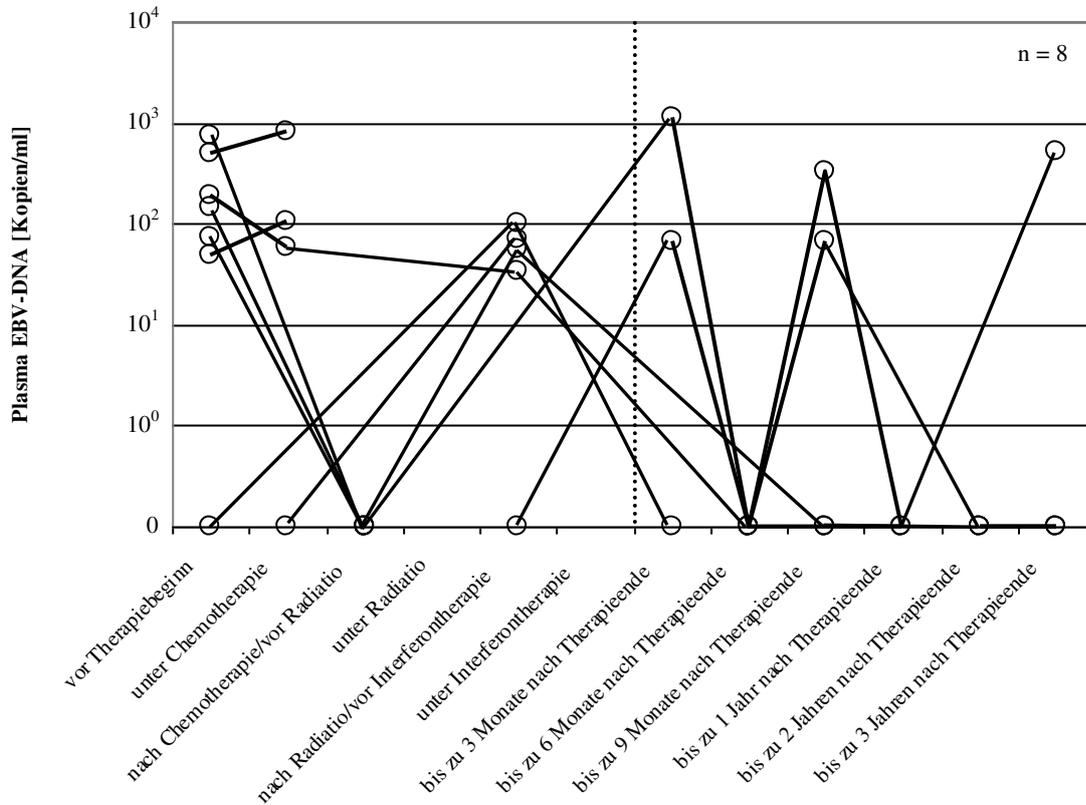
Verlauf von Plasma EBV-DNA während und nach Beendigung der Therapie



**Abb. 26:** Darstellung von EBV-DNA im Plasma von 16 NPC-Patienten zu Beginn und im Verlauf einer Therapie. Die Abbildung zeigt, dass die Konzentration von EBV-DNA bereits zu Beginn der Therapie abnimmt und nach etwa drei Monaten nach Beendigung der Therapie nicht mehr nachweisbar ist. In den Kontrolluntersuchungen bis zu drei Jahren nach Beendigung der Therapie konnten ebenfalls keine EBV-DNA im Plasma dieser Patienten festgestellt werden. NPC-Patienten, die bereits vor der Therapie negativ auf EBV-DNA waren, blieben auch über die ganze Zeitdauer negativ.

Acht der 42 NPC-Patienten in kompletter Remission zeigten allerdings im Verlauf sowie nach Beendigung der Therapie passager nachweisbare Konzentration von EBV-DNA im Plasma. Unter diesen waren auch die NPC-Patienten, bei denen vor Therapiebeginn keine Kopien von EBV-DNA nachweisbar waren.

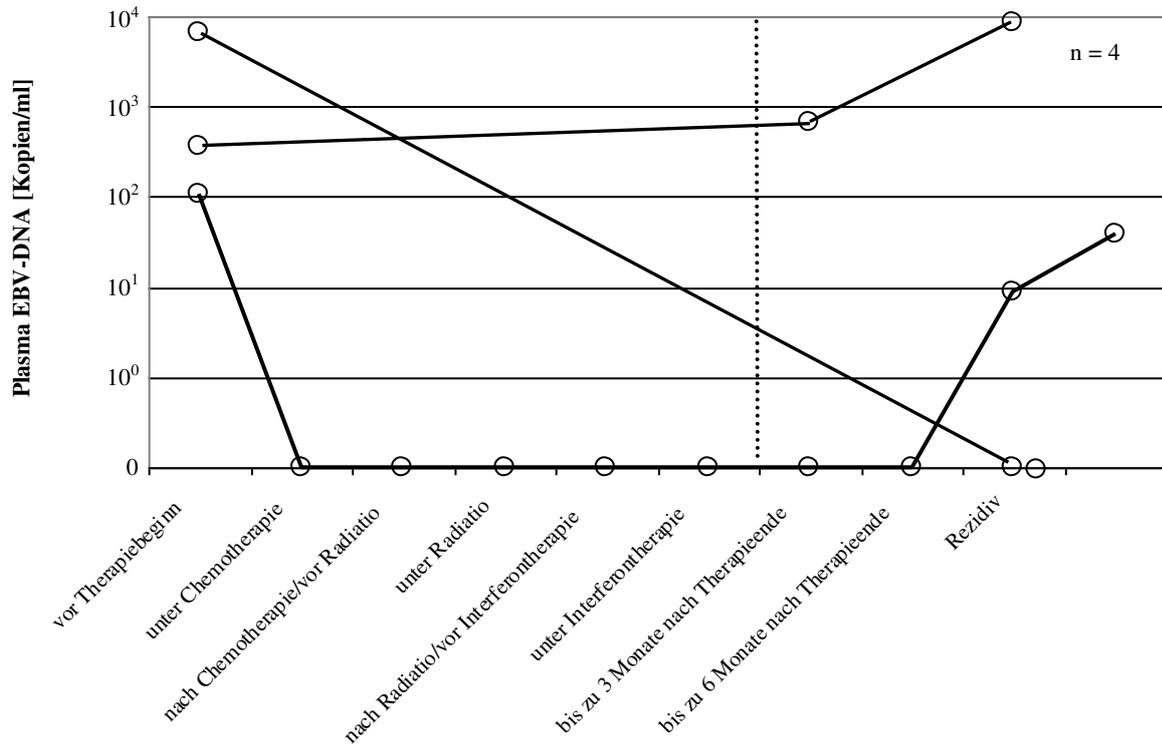
**Verlauf der Plasma EBV-DNA während und nach Beendigung der Therapie bei acht Patienten mit intermittierend positivem EBV-DNA-Nachweis im Plasma**



**Abb. 27:** Dargestellt sind die Verläufe von EBV-DNA im Plasma der acht NPC-Patienten in kompletter Remission während und nach Beendigung der Therapie. Zu sehen ist, dass passager im Plasma der jeweiligen NPC-Patienten Konzentrationen von EBV-DNA nachweisbar sind.

Unterschiedliche Verläufe der Konzentration von EBV-DNA im Plasma wiesen die vier NPC-Patienten mit einem Rezidiv des NPC auf. Bei einer Patientin lag nur eine Plasmaprobe im Rezidiv zur Auswertung vor, in der keine Kopien von EBV-DNA nachgewiesen wurden. Der zweite Patient zeigte vor Therapie eine nachweisbare EBV-DNA-Viruslast im Plasma und im Rezidiv keine nachweisbare EBV-DNA-Viruslast im Plasma. Der dritte Patient hatte vor Beginn der Therapie eine nachweisbare Konzentration von EBV-DNA im Plasma, welche dann unter Therapie nicht mehr detektierbar war, aber er hatte wiederum erhöhte Werte vom Plasma EBV-DNA unter Entwicklung eines Rezidivs. Beim letzten Rezidivpatienten konnten vor Therapiebeginn bis zur Entwicklung des NPC-Rezidivs durchgehend EBV-DNA im Plasma detektiert werden.

**Verlauf der Plasma EBV-DNA während der Therapie bei NPC-Patienten mit einem Rezidiv**



**Abb. 28:** Abgebildet sind die Verläufe von EBV-DNA im Plasma von vier Rezidiv-Patienten vor Therapiebeginn und nach Beendigung der Therapie sowie beim Auftreten des Rezidivs.

## 4. DISKUSSION

Enge Assoziationen zwischen dem Epstein-Barr-Virus (EBV) und der Entwicklung von Nasopharynxkarzinomen wurden festgestellt: EBV-DNA und -Proteine sind in nahezu allen primären Tumorzellen sowie in Metastasen nachweisbar (Chang Y.S. et al., 1990; Chen C.L. et al., 1993; Macdonald M.R. et al., 1995; Lee W.Y. et al., 2000; Tsai S.T. et al., 1996). Des Weiteren wurde EBV auch in prämaligen nasopharyngealen Läsionen sowie in Karzinomen „*in situ*“ und in präkanzerösen Dysplasien detektiert (Pathmanathan R. et al., 1995). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von hohen Konzentrationen von Antikörpern gegen EBV-Proteinen in gesunden Menschen mit einem höheren Risiko zur Entwicklung eines Nasopharynxkarzinoms korrelierte (Chien Y.-C. et al., 2001). Außerdem wurde bei Patienten mit einem Nasopharynxkarzinom gezeigt, dass der Nachweis von EBV-DNA in peripheren Blutzellen mit einem hohen Risiko von Fernmetastasen und mit einem geringen Überleben einhergeht (Lin J.C. et al., 2001).

### 4.1 EBV-Lastmessung im Plasma bei NPC-Patienten

In einer Arbeit von Lo et al. wurde festgestellt, dass bei fast allen erwachsenen Patienten mit einem Nasopharynxkarzinom EBV-DNA im Plasma nachweisbar war, wohingegen nur wenige Kontrollpersonen positive EBV-Last im Plasma aufwiesen (Lo Y.M.D, Chan L.Y.S., Lo K.-W. et al., 1999). Ebenso wurde gezeigt, dass eine Korrelation zwischen der Konzentration von EBV-DNA im Plasma und dem Tumorstadium sowie der Wahrscheinlichkeit eines Rezidives und des Überlebens als auch das Vorhandensein von Resterkrankung nach einer Strahlentherapie bei erwachsenen Patienten mit Nasopharynxkarzinom besteht (Lo Y.M.D., Leung S.F., Chan L.Y.S. et al., 2000; Lo Y.M.D., Chan L.Y.S., Chan A.T.C. et al., 1999; Lo Y.M.D., Chan A.T.C., Chan L.Y.S. et al., 2000; Chan A.T.C. et al., 2002). Ngan et al. konnten in einer kleinen Gruppe von erwachsenen NPC-Patienten feststellen, dass etwa vier Monate vor dem Auftreten eines Rezidives EBV-DNA im Plasma nachweisbar ist (Ngan R.K.C. et al, 2001).

Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass fast bei allen pädiatrischen Patienten mit einem Nasopharynxkarzinom Plasma-EBV-DNA detektierbar war. Des Weiteren

wurde festgestellt, dass die Konzentration von EBV-DNA im Plasma bereits unter einer Radiochemotherapie gemäß dem NPC-2003-GPOH-Studienprotokoll abnahm. Nach Beendigung der Therapie war EBV-DNA im Plasma nur noch bei sehr wenigen Patienten mit einer kompletten Remission detektierbar. Bei den vier Patienten, die ein Rezidiv entwickelten, zeigten sich allerdings kontroverse Ergebnisse. Die Proben von den Rezidiv-Patienten waren in sehr geringer Anzahl vorhanden, so dass die kontrovers erzielten Ergebnisse aufgrund der geringen Anzahl der Proben schwierig zu deuten sind. Auch die Zahl der Proben bei den Patienten mit einer kompletten Remission nach und unter der Therapie gemäß dem NPC-2003-GPOH-Studienprotokoll war beschränkt, jedoch zeigte sich trotz der nicht hohen Anzahl der Proben eine Tendenz, so dass eine verwertbare Aussage bestand. Nur bei wenigen NPC-Patienten mit einer kompletten Remission zeigten sich im Verlauf der Therapie gemäß dem NPC-2003-GPOH-Studienprotokoll stark schwankende Konzentrationen von Plasma-EBV-DNA. Zusammenfassend zeigen die Daten dieser Arbeit, dass die Konzentration von EBV-DNA ein nützlicher molekularer Marker für das Ansprechen auf die Therapie ist.

#### **4.2 EBV-Lastmessung in PBMCs bei NPC-Patienten**

In einer Arbeit von Ruf und Wagner konnte gezeigt werden, dass sich die Bestimmung von EBV-DNA in den PBMCs zur Überwachung der pädiatrischen Patienten nach einer allogenen Stammzell- und Organtransplantation eignet (Ruf S. and Wagner H.-J., 2013). Weiterhin wurde bisher festgestellt, dass die Bestimmung der Konzentration von EBV-DNA im Vollblut und in PBMCs aufgrund der besseren Empfindlichkeit geeigneter zur Überwachung bei den Transplantationspatienten ist als die Quantifizierung der EBV-DNA im Plasma (Ruiz G. et al., 2005; Hakim H. et al., 2007; Wada K. et al, 2007). Da es bisher keine vergleichbaren Arbeiten bei den Patienten mit einem Nasopharynxkarzinom gibt, wurde in dieser Arbeit dementsprechend überprüft, ob die Bestimmung von EBV-DNA in den PBMCs auch zur Überwachung der NPC-Patienten geeignet ist. Es stellte sich heraus, dass die Bestimmung von EBV-DNA in PBMCs weder zur Überwachung des Therapieansprechens noch zur Früherkennung eines NPC-Rezidives geeignet scheint. Der Grund könnte darin liegen, dass die EBV-Last in PBMCs die „nicht-maligne“ natürliche persistierende EBV-Infektion reflektiert, wohingegen EBV-DNA aus den lokalen Tumorzellen im Nasopharynx in das Plasma gelangt.

### 4.3 EBV-Serologie bei NPC-Patienten

Bei Immunkomponenten sind die EBV-spezifische Antikörper zur Unterscheidung zwischen einer akuten Infektion oder einer Reaktivierung zuverlässig einsetzbar (Svahn A. et al., 1997). Die EBV-assoziierten Krebserkrankungen kennzeichnen sich durch das hohe Aufkommen von Antikörpern gegen Frühantigen (EA) und Viruskapsid (VCA) von EBV. Insbesondere wurden bei NPC-Patienten erhöhte Titer gegen VCA-IgA festgestellt, welche beim Screening zur Früherkennung von Nasopharynxkarzinomen nützlich sein könnte (Weinreb M. et al., 1996). Die Bildung von Antikörper gegen EBNA hingegen wird reduziert, so dass die Bestimmung dieser Antikörper zur Stellung der Diagnose nicht hilfreich ist (Niedobitek G. et al., 1992). Eine zentrale Bedeutung schien das Protein LMP-1 zu haben. Es wurde festgestellt, dass die Expression von LMP-1 (*latent membrane protein-1*) in den NPC zur Erleichterung eines invasiven Wachstums sowie einer Metastasenentstehung führt (Niller H.H. et al., 2009). Weiterhin wurde in einer Arbeit von de-Vathaire gezeigt, dass Rezidiv-Patienten ein Jahr nach Abschluss der Strahlentherapie signifikant erhöhte EA-IgG-, insbesondere EA-IgA-Titer nachwiesen (de-Vathaire et al., 1988). Zudem stellten Gu A.D. et al. fest, dass EBV-Antikörperspiegel ähnlich zu den Untersuchungen von EBV-DNA im Plasma mit frühen klinischen Ereignissen der NPC-Patienten nach Therapie korreliert (Gu A.-D. et al., 2009).

In dieser Arbeit wurde überprüft, ob die Bestimmung von EA-IgG, EA-IgA und EA-IgM sowie EBNA-1-IgG für die Überwachung des Therapieansprechens sowie der Erkennung eines Rezidives hinzugezogen werden kann. Für die Auswertung der Serologien von NPC-Patienten, die nach Beendigung der Therapie eine komplette Remission erreichten, standen 127 Proben von 41 Patienten zur Verfügung, aufgeteilt in Proben vor Therapiebeginn und nach Therapieende. Des Weiteren wurden 16 Proben von 3 NPC-Patienten ausgewertet.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass alle NPC-Patienten als Zeichen einer durchgemachten EBV-Infektion EBNA-1-IgG aufwiesen. Nach einer entsprechenden Therapie nach dem NPC-2003-GPOH-Studienprotokoll konnte keine signifikante Erniedrigung der Konzentration von EBNA-1-IgG festgestellt werden. Bei der Mehrzahl der Gesunden war ebenfalls EBNA-1-IgG nachweisbar, allerdings war der Titer im Vergleich zu den NPC-Patienten niedriger. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei der Untersuchung mit dem Antikörper EA-IgG. Bei EA-IgM kommt es unter Therapie zwar zu einer abfallenden Konzentration, jedoch gibt es keinen Unterschied zum Kontrollkollektiv.

Bei EA-IgA zeigte sich weder bei den therapienaiven NPC-Patienten noch bei den NPC-Patienten nach Behandlung noch bei den Kontrollprobanden ein Konzentrationsunterschied.

Insgesamt zeigte die Auswertung dieser Proben, dass die Bestimmung dieser Antikörper zum einen nicht zur Überwachung des Therapieansprechens von NPC-Patienten mit späterer kompletter Remission und zum anderen nicht zur Früherkennung eines NPC-Rezidives geeignet ist. Allerdings waren die Proben von den Rezidiv-Patienten des NPC in geringer Anzahl vorhanden, so dass bei einer höheren Anzahl an zu auswertbaren Proben eventuell ein anderes Ergebnis erzielt werden könnte.

#### **4.4 Schlussfolgerung**

In dieser Arbeit wurden die Korrelationen zwischen den Konzentrationen von Plasma-EBV-DNA, EBV-DNA in PBMCs und der EBV-Serologie und dem Therapieansprechen des Nasopharynxkarzinoms mit einer Behandlung gemäß dem NPC-2003-GPOH-Studienprotokoll sowie die Früherkennung eines NPC-Rezidives untersucht. Lo Y.M.D. et al. konnten zeigen, dass es eine Korrelation zwischen der Konzentration von EBV-DNA im Plasma und dem Tumorstadium, aber auch der Wahrscheinlichkeit einer Rezidiventwicklung sowie das Vorhandensein von Resterkrankung nach einer Strahlentherapie bei Patienten mit Nasopharynxkarzinom besteht. Weiterhin konnten Ngan et al. feststellen, dass etwa vier Monate vor dem Auftreten eines Rezidives EBV-DNA im Plasma nachweisbar ist. Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit Behandlung des NPC gemäß dem NPC-2003-GPOH-Studienprotokoll die Konzentration der Plasma-EBV-DNA im Verlauf der Therapie sinkt und nach Beendigung der Therapie mit Erreichen einer kompletten Remission kaum noch nachweisbar ist. Ein ähnliches Ergebnis konnte mit der Bestimmung von EBV-DNA in den PBMCs nicht erzielt werden. Weiterhin konnten Gu A.-D. et al. feststellen, dass EBV-Antikörperspiegel mit frühen klinischen Ereignissen der NPC-Patienten nach Behandlung, ähnlich zu den Untersuchungen von EBV-DNA im Plasma, korreliert. In dieser Arbeit wurde jedoch im Gegensatz zu der Arbeit von Gu A.-D. et al. gezeigt, dass die Konzentrationsbestimmung der EBV-Antikörper wie EA-IgG, EA-IgA, EA-IgM und EBNA-1-IgG bei den NPC-Patienten keine Aussagekraft hinsichtlich des Therapieansprechens oder einer Früherkennung eines NPC-Rezidives hat.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Das zu der Gruppe der Kopf-Hals-Tumoren gehörende Nasopharynxkarzinom (NPC) hat eine hohe Inzidenz in Südostchina und ist mit etwa 70% der häufigste maligne Tumor im Bereich des Pharynx. Insgesamt ist das NPC jedoch in Mitteleuropa ein seltener Tumor mit einem Gesamtanteil von 0,2% aller Tumorerkrankungen und macht in der Kindheit nur etwa 1% aller Malignome aus. Neben verschiedenen Umweltfaktoren, Ernährungsgewohnheiten und genetische Faktoren wie z. B. die Assoziation mit HLA-A2, HLA-B17 und HLA-Bw46 wird insbesondere die Infektion der Zellen mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) als Ursache für die Entstehung des NPC gesehen. Bei nahezu allen Patienten mit einem NPC konnte EBV-DNA im Plasma nachgewiesen werden. Ebenso zeigte sich, dass es eine Korrelation zwischen der Konzentration von EBV-DNA im Plasma und dem Tumorstadium, der Rezidivwahrscheinlichkeit, des Überlebens sowie das Vorhandensein von Resterkrankung nach einer Strahlentherapie bei Patienten mit NPC gibt. In dieser Arbeit konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Nasopharynxkarzinomen und dem Nachweis von Plasma-EBV-DNA festgestellt werden. Erhöhte Konzentrationen an Plasma-EBV-DNA lassen sich bei Patienten mit einem NPC nachweisen, welche bereits während der Behandlung gemäß dem NPC-2003-GPOH-Studienprotokoll abnehmen und nach Beendigung der Therapie kaum noch nachweisbar sind. Demzufolge eignet sich die Bestimmung von Plasma-EBV-DNA zur Überwachung von NPC-Patienten.

Die Bestimmung von EBV-DNA in den PBMCs ist zwar zur Überwachung der pädiatrischen Patienten nach einer allogenen Stammzell- oder Organtransplantation brauchbar, nicht aber zur Überwachung von NPC-Patienten.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die EBV-Serologie zur Überwachung des Therapieansprechens sowie der Früherkennung eines Rezidives bei pädiatrischen Patienten mit NPC weniger geeignet ist.

*Schlüsselwörter: Nasopharynxkarzinom, Epstein-Barr-Virus, EBV-DNA, EBV-Serologie*

## 6. ABSTRACT

Nasopharyngeal carcinoma (NPC), which has a high incidence in southeast China and belongs to the group of head and neck cancer, is about 70% of the most common malignant tumor in the region of the pharynx. Overall, but NPC is a rare tumor in Central Europe with a total amount of 0.2% of all tumors and makes only about 1% of all malignancies in childhood. In addition to various environmental factors, diet and genetic factors such as the association with HLA-A2, HLA-B17 and HLA-Bw46 in particular the infection of the cells with Epstein-Barr virus (EBV) is a causative factor for the development of NPC. In almost all patients with NPC EBV DNA is detectable in plasma. Similarly, it was found that there is a correlation between the concentration of EBV DNA in plasma and tumor stage, recurrence probability of survival as well as the presence of residual disease after radiotherapy in patients with NPC. In this work, we demonstrated a correlation between the activity of nasopharyngeal carcinoma and plasma EBV DNA. Elevated concentration of plasma EBV-DNA was detected in pediatric patients with NPC, which decreased during the treatment according to the NPC-2003 GPOH study protocol and barely detectable after cessation of therapy. Therefore, the determination of plasma EBV-DNA is suitable for monitoring of NPC patients.

The determination of EBV-DNA in the PBMCs is although useful for monitoring of pediatric patients after an allogenic stem cell transplantation and solid organ transplantation, but not for monitoring of the NPC patients.

Furthermore, EBV serology is less suitable for the monitoring of treatment response as well as early detection of recurrence of pediatric patients with NPC.

*Keywords: Nasopharyngeal carcinoma, Epstein-Barr virus, EBV DNA, EBV serology*

## 7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

In der unten aufgeführten Liste sind keine allgemein gebräuchlichen Abkürzungen der Biochemie oder Molekularbiologie (wie z. B. min, µl, DNA, usw.) sowie auch keine zu den SI-Einheiten (Système International d'Unités) zählenden Abkürzungen enthalten.

Abb.	Abbildung
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>
ATCC	<i>American Tissue and Cell Culture Collection</i>
BARTs	<i>BamHI-A rightward transcripts</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
c-fgr	<i>Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog</i>
CRP	C-reaktives Protein
Ct	<i>cycle threshold</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	<i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>
E	<i>early</i>
EA	<i>early antigen</i>
EBER	<i>EBV-encoded small RNA</i>
EBNA	<i>EBV-encoded nuclear antigen</i>
EBNA-LP	<i>EBV-encoded nuclear antigen leader protein</i>
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EBV EA-D	<i>EBV early antigen-diffuse</i>
EDTA	<u>E</u> thylend <u>a</u> mintetra <u>a</u> ccetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FAM	<i>6-carboxy-fluorescein</i>
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
GPOH	Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
IE	<i>immediate early</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
L	<i>late</i>
LMP	<i>latent membrane protein</i>
MYC	<i>myelocytomatosis oncogene</i>
NF-kB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NPC	<i>nasopharyngeal carcinoma</i>
OD	optische Dichte
ORFs	<i>open-reading frames</i>

PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
Q	Quencher-Farbstoff
R	Reporterfarbstoff
RBP-Jκ	<i>recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RQ-PCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion in Echtzeit ( <i>real time quantitative polymerase chain reaction</i> )
SDS	Sequence Detection System
TAMRA	<i>6-carboxytetramethyl-rhodamine</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TMB	<i>3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine</i>
TPA	<i>12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat</i>
TX	Transplantation
VCA	<i>virale capsid-antigen</i>
VIC	<i>4,7,2'-trichloro-7'-phenyl-6-carboxyfluorescein</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
XLP	X-chromosomale lymphoproliferative Erkrankung

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Aiyar A., Tyree C. and Sugden B. (1998). The plasmid replicon of EBV consists of multiple cis-acting elements that facilitate DNA synthesis by the cell and a viral maintenance element. *Embo J* 17(21), 6394-403.
2. Bagert B.A. (2009). Epstein-Barr virus in multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep Bd.* 9, Nr. 5, S. 405-410.
3. Baker S.D. and Mc Clatchey K.D. (1981). Carcinoma of the nasopharynx in childhood. *Otolarynol*; 89: 555-559.
4. Brockmeier S., Ihrler S., Grosu A., Zimmermann F. (2009). "Malignome des Nasopharynx", in "MANUAL Kopf-Hals-Malignome", Tumorzentrum München, W. Zuckerschwerdt Verlag, München. S. 234-242.
5. Buehrlen M. et al. (2012). Multimodal Treatment, Including Interferon Beta, of Nasopharyngeal Carcinoma in Children and Young Adults. Preliminary Results From the Prospective, Multicenter Study NPC-2003-GPOH/DCOG.
6. Chen C.L., Wen W.N., Chen J.Y., Hsu M.M. and Hsu H.C. (1993). Detection of Epstein-Barr virus genome in nasopharyngeal carcinoma by in situ DNA hybridization. *Intervirology*; 36: 91-8.
7. Chan A., Teo P. and Johnson P. (2002). Nasopharyngeal Carcinoma. *Ann Oncol*; 13: 1007-1015.
8. Chan A.T. et al. (2002). Concurrent chemotherapy-radiotherapy compared with radiotherapy alone in locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma: progression-free survival analysis of a phase III randomised trial. *J Clin Oncol*, 20, S. 2038-44.
9. Chan A.T.C., Lo Y.M.D., Zee B. et al. (2002). Plasma Epstein-Barr virus DNA and residual disease after radiotherapy for undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *J Natl Cancer Inst*; 94: 1614-9.
10. Chang E. and Adami H. (2006). The enigmatic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*.
11. Chang Y.S., Tyan Y.S., Liu S.T., Tsai M.S. and Pao C.C. (1990). Detection of Epstein-Barr virus DNA sequences in nasopharyngeal carcinoma cells by enzymatic DNA amplification. *J Clin Microbiol*; 28: 2398-402.
12. Cheung A. and Kieff E. (1982). Long internal direct repeat in Epstein-Barr virus DNA. *J Virol*, 44: 286-294. PMID: 6292491.
13. Chien Y.-C., Chen J.-Y., Liu M.-Y. et al. (2001). Serologic markers of Epstein-Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma in Taiwanese men. *N Engl J Med*; 345: 1877-82.
14. Cohen J.I. (2000). Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med* 343:481-492.

15. Cordier M., Calender A., Billaud M., Zimmer U., Rousselet G., Pavlish O., Banchereau J., Tursz T., Bornkamm G. and Lenoir G.M. (1990). 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*, 64, 1002-13.
16. Dellian M. et al. (2003). Malignome des Nasopharynx. Aus: Manual Kopf-Hals-Malignome. 3. Auflage. Wollenberg B. et al. (Hrsg). Tumorzentrum München und Zuckschwerdt-Verlag München.
17. de-Vathaire F., Sancho-Garnier H., de-The H., Pieddeloup C., Schwaab G., Ho J.H., Ellouz R., Micheau C., Cammoun M., Cachin Y. et al. (1988). Prognostic value of EBV markers in the clinical management of nasopharyngeal carcinoma (NPC): a multicenter follow-up study. *Int J Cancer*, 42: 176-181.
18. Faulkner G.C., Krajewski A.S. and Crawford D.H. (2000). The ins and outs of EBV infection. *Trends Microbiol*, 8, 185-9.
19. Fischer M., Stüben G., Klahold M. (2001). Accelerated hyperfractionated radiotherapy with concurrent chemotherapy in locally advanced nasopharyngeal carcinoma: a phase II study. *J Cancer Res Clin Oncol*; 127: 507-511.
20. Ghandi M.K. (2006). Epstein-Barr virus-associated lymphomas. In: *Expert Rev Anti Infect Ther* Bd. 4, Nr. 1, S. 77-89.
21. Gu A.-D., Lu L.-X., Xie Y.-B., Chen L.-Z., Feng Q.-S., Kang T., Jia W.-H. and Zeng Y.-Z. (2009). Clinical values of multiple Epstein-Barr virus (EBV) serological biomarkers detected by xMAP technology. *J Transl Med*, 7: 73 doi: 10.1186/1479-5876-7-73.
22. Hakim H., Gibson C., Pan J., Srivastava K., Gu Z., Bankowski M.J. et al. (2007). Comparison of various blood compartments and reporting units for the detection and quantification of Epstein-Barr virus in peripheral blood. *J Clin Microbiol*; 45: 2151-5.
23. Hayward S.D. and Kieff E. (1977). DNA of Epstein-Barr virus. II. Comparison of the molecular weights of restriction endonuclease fragments of the DNA of Epstein-Barr virus strains and identification of end fragments of the B95-8 strain. *J Virol* 23(2), 421-9.
24. Henderson A., Ripley S., Heller M. and Kieff E. (1983). Chromosome site for Epstein-Barr virus DNA in a Burkitt tumor cell line and in lymphocytes growth-transformed in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 80, 1987-1991.
25. Henle W. and Henle G. (1979). Seroepidemiology of the virus. In: Epstein M.A., Achong B.G. (eds) *The Epstein-Barr virus*. Springer, Berlin, S. 61-78.
26. Jin-Ching L., Wen-Yi W., Kuang Y. C., Yau-Huei W., Wen-Miin L., Jian-Sheng J. and Rong-San J. (2004). Quantification of Plasma Epstein-Barr Virus DNA in Patients with Advanced Nasopharyngeal Carcinoma. *N Engl J Med*; 350: 2461-70.

27. Karran L., Jones M., Morley G. et al. (1995). Expression of a B-cell marker, CD24, on nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Cancer*; 60: 562-6.
28. Kaye K.M., Izumi K.M. and Kieff E. (1993). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(19), 9150-4.
29. Kieff E. and Rickinson A. (2006). Epstein-Barr virus and its replication. In: Knipe D.M.H., Peter M. and Griffin D.E. (ed.) *Fields Virology*. 5th ed.: Lippincott Williams & Wilkins.
30. Kieff E. and Rickinson A.B. (2001). Epstein-Barr virus and its replication. In: *Fields Virology*. Fields B.N., Knipe D.M., Howley P. et al., editors. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, pp. 2511-2575.
31. Kilger E., Kieser A., Baumann M. and Hammerschmidt W. (1998). Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *EMBO J*, 17, 1700-9.
32. Krüger G.R.F. and Wustrow J. (1981). Current classification of nasopharyngeal carcinoma at Cologne University. In: Grundmann E., Krüger G.R.F., Ablashi D.V., eds. *Nasopharyngeal carcinoma*, vol 5. Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag; 11-5.
33. Kuppers R. (2003). B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol*, 3, 801-12.
34. Lee M.A., Diamond M.E. and Yates J.L. (1999). Genetic evidence that EBNA-1 is needed for efficient, stable latent infection by Epstein-Barr virus. *J Virol*, 73, 2974-82.
35. Lee W.Y., Hsiao J.R., Jin Y.T. and Tsai S.T. (2000). Epstein-Barr virus detection in neck metastases by in-situ hybridization in fine-needle aspiration cytologic studies: an aid for differentiating the primary site. *Head Neck*; 22: 336-40.
36. Lenarz T., Boenninghaus H.-G. (2007). "HNO", 13. Auflage, Springer, Stuttgart. S. 136, S. 201 f, S. 209, S. 232 f.
37. Lin J.C., Chen K.Y., Wang W.Y. et al. (2001). Detection of Epstein-Barr virus DNA in the peripheral-blood cells of patients with nasopharyngeal carcinoma: relationship to distant metastasis and survival. *J Clin Oncol*; 19: 2607-15.
38. Lindahl T., Adams A., Bjursell G., Bornkamm G.W., Kaschka-Dierich C. and Jehn U. (1976). Covalently closed circular duplex DNA of Epstein-Barr virus in a human lymphoid cell line. *J Mol Biol* 102(3), 511-30.
39. Lo Y.M.D., Chan L.Y.S., Lo K.-W. et al. (1999). Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*; 59: 1188-91.

40. Lo Y.M.D., Leung S.F., Chan L.Y.S. et al. (2000). Plasma cell-free Epstein-Barr virus DNA quantitation in patients with nasopharyngeal carcinoma: correlation with clinical staging. *Ann N Y Acad Sci*; 906: 99-101.
41. Lo Y.M.D., Chan L.Y.S., Chan A.T.C. et al. (1999). Quantitative and temporal correlation between circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA and tumor recurrence in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*; 59: 5452-5.
42. Lo Y.M.D., Chan A.T.C., Chan L.Y.S. et al. (2000). Molecular prognostication of nasopharyngeal carcinoma by quantitative analysis of circulating Epstein-Barr virus DNA. *Cancer Res*; 60: 6878-81.
43. Longnecker R. (2000). Epstein-Barr virus latency: LMP2, a regulator or means for Epstein-Barr virus persistence? *Adv Cancer Res*, 79, 175-200.
44. Macdonald M.R., Freeman J.L., Hui M.F. et al. (1995). Role of Epstein-Barr virus in fine-needle aspirates of metastatic neck nodes in the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck*; 17: 487-93.
45. Maeda E. et al. (2009). Spectrum of Epstein-Barr virus-related diseases: a pictorial review. In: *Jpn J Radiol. Bd. 27, Nr. 1, S. 4-19*.
46. Mould R. and Tai T. (2002). Nasopharyngeal carcinoma: treatments and outcomes in the 20th century. *Br J Radiol*; 75: 307-339.
47. Naumann H., Helms J., Herberhold C., Kastenbauer E. (Hrsg.). (1992). "Oto-Rhinolaryngologie in Klinik und Praxis", 1. Auflage, Thieme, Stuttgart. S.669-675.
48. Ngan R.K.C., Lau W.H., Yip T.T.C. et al. (2001). Remarkable application of serum EBV EBER-1 in monitoring response of nasopharyngeal cancer patients to salvage chemotherapy. *Ann N Y Acad Sci*; 945: 73-9.
49. Niedobitek G., Fahraeus R., Herbst H. et al. (1992). The Epstein-Barr virus encoded membrane protein (LMP) induces phenotypic changes in epithelial cells. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*; 62: 55-9.
50. Niller H.H., Wolf H. and Minarovits J. (2009). Epigenetic dysregulation of the host cell genome in Epstein-Barr virus-associated neoplasia. *Semin Cancer Biol*; 19: 158-64.
51. Ocheni S., Olusina D.B., Oyekunle A.A., Ibegbulam O.G., Kröger N., Bacher U. and Zander A.R. (2010). EBV-Associated Malignancies. *The Open Infectious Dis J*, 4, 101-112.
52. Pathmanathan R., Prasad U., Sadler R., Flynn K. and Raab-Traub N. (1995). Clonal proliferations of cells infected with Epstein-Barr virus in preinvasive lesions related to nasopharyngeal carcinoma. *N Engl J Med*; 333: 693-8.
53. Raab-Traub N. and Flynn K. (1986). The structure of the termini of the Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation. *Cell*, 47: 883-889. doi: 10.1016/0092-8674(86)90803-2 PMID: 3022942.

54. Rezk S.A. and Weiss L.M. (2009). Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. *Hum Pathol Bd.* 38, Nr. 9, S. 1293-1304.
55. Rowe M. et al. (2009). Burkitt's lymphoma: the Rosetta Stone deciphering Epstein-Barr virus biology. *Semin Cancer Biol Bd.* 19, Nr. 6, S. 377-388.
56. Ruf S. and Wagner H.-J. (2013). Determining EBV load: current best practice and future requirements. *Expert Rev Clin Immunol* 9 (2): 139-51. doi: 10.1586/eci.12.111.
57. Ruiz G., Pilar Pena P., de Ory F. and Echevarría J.E. (2005). Comparison of commercial real-time PCR assays for quantification of Epstein-Barr virus DNA. *J Clin Microbiol*; 43: 2053-7.
58. Sinclair A.J., Palermo I., Peters G. and Farrell P.J. (1994). EBNA-2 and EBNA-LP cooperate to cause G0 to G1 transition during immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *EMBO J*, 13, 3321-8.
59. Svahn A., Magnusson M., Jagdahl L., Schloss L., Kahlmeter G. and Linde A. (1997). Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays and two latex agglutination assays for diagnosis of primary Epstein-Barr virus infection. *J Clin Microbiol*; 35: 2728-32.
60. Takada K., Komano J. and Imai S. (1999). The role of Epstein-Barr virus in oncogenesis. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 44(16), 2565-74.
61. Tomkinson B. and Kieff E. (1992). Use of second-site homologous recombination to demonstrate that Epstein-Barr virus nuclear protein 3B is not important for lymphocyte infection or growth transformation in vitro. *J Virol*, 66, 2893-903.
62. Toussiro E. and Roudier J. (2008). Epstein-Barr virus in autoimmune diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol Bd.* 22, Nr. 5, S. 883-896.
63. Tsai S.T., Jin Y.T. and Su I.J. (1996). Expression of EBER1 in primary and metastatic nasopharyngeal carcinoma tissues using in situ hybridization: a correlation with WHO histologic subtypes. *Cancer*; 77: 231-6.
64. Tsurumi T., Fujita M. and Kudoh A. (2005). Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies. *Rev Med Virol*, 15, 3-15.
65. Vasef M.A. et. al. (1997). Nasopharyngeal carcinoma, with emphasis on its relationship to Epstein-Barr virus. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 106(4), S. 348-56.
66. Vokes E., Liebowitz D. and Weichselbaum R. (1998). Nasopharyngeal Carcinoma. 350: 1087-1091.
67. Vokes E.E. et al. (2000). Concomitant chemoradiotherapy as primary therapy for locoregionally advanced head and neck cancer. *J Clin Oncol*, 18, S.1652-61.
68. Vokes E.E. et. al. (1997). Nasopharyngeal carcinoma, 350, S.1087-91.

69. Wada K., Kubota N., Ito Y., Yagasaki H., Kato K., Yoshikawa T. et al. (2007). Simultaneous quantification of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and human herpesvirus 6 DNA in samples from transplant recipients by multiplex realtime PCR assay. *J Clin Microbiol*; 45: 1426-32.
70. Wannemacher M., Debus J. and Wenz F. (2006). (Hrsg.): "Strahlentherapie", 1. Auflage, Springer, Berlin. S. 11 f., S. 197 ff., S. 285 ff., S.374 ff., S. 412.
71. Weinreb M., Day P.J.R., Niggli F. et al. (1996). The role of Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease from different geographical areas. *Arch Dis Child*; 74: 27-31.
72. Yates J.L., Warren N. and Sugden B. (1985). Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature*, 313, 812-5.
73. Young L.S. and Murray P.G. (2003). Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene*, 22, 5108-21.
74. Young L.S. and Rickinson A.B. (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer*, 4, 757-68.

## 9. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Waltrop, 01.07.2016

---

(Unterschrift)

Caroline Rosalie Gauch

## **10. DANKSAGUNG**

Hiermit möchte ich mich herzlichst bei Herrn Prof. Dr. med. H. J. Wagner für die hervorragende Betreuung und Hilfsbereitschaft bedanken. Auch möchte ich mich für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens bei ihm bedanken.

Des Weiteren gilt ein besonderer Dank an die Mitarbeiter des Labors für ihre Hilfsbereitschaft, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Stets bestand im Labor eine freundschaftliche Atmosphäre, die das Arbeiten im Labor angenehm machte.

Weiterhin möchte ich mich bei meiner Familie ganz besonders herzlich bedanken für die liebevolle und uneingeschränkte Unterstützung während meines Studiums.

Zudem danke ich meinem Freund Ahmet, der mich stets zur Erstellung dieser Dissertation unterstützt hat.