

**Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin**

**der Universität zu Lübeck**

**Direktor: Prof. Dr. med. Egbert Herting**

---

**Epstein-Barr-Virus-spezifisches molekulares**

**Monitoring für die Diagnose einer**

**lymphoproliferativen Erkrankung nach**

**Herztransplantation im Kindesalter**

---

**Inauguraldissertation**

**zur**

**Erlangung der Doktorwürde**

**der Universität zu Lübeck**

**- Aus der Medizinischen Fakultät -**

**vorgelegt von**

**Anja Schuster**

**aus Hamburg**

**Lübeck 2008**

**Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin**

**der Universität zu Lübeck**

**Direktor: Prof. Dr. med. Egbert Herting**

---

**Epstein-Barr-Virus-spezifisches molekulares**

**Monitoring für die Diagnose einer**

**lymphoproliferativen Erkrankung nach**

**Herztransplantation im Kindesalter**

---

**Inauguraldissertation**

**zur**

**Erlangung der Doktorwürde**

**der Universität zu Lübeck**

**- Aus der Medizinischen Fakultät -**

**vorgelegt von**

**Anja Schuster**

**aus Hamburg**

**Lübeck 2008**

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Hans-Joachim Wagner

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Wolfram Jabs

Tag der mündlichen Prüfung: 01.08.2008

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 01.08.2008

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach  
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>I</b>
<b>VERZEICHNIS DER IM TEXT VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>III</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das Epstein-Barr-Virus .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Die Entdeckung des Epstein-Barr Virus.....	1
1.1.2 Biologie des Epstein-Barr Virus.....	1
1.1.3 EBV-assoziierte Erkrankungen.....	2
1.1.4 Der Infektionsweg von EBV .....	3
1.1.5 Wirkungen einiger Genprodukte .....	5
<b>1.2 Lymphoproliferative Erkrankungen nach Organtransplantation .....</b>	<b>6</b>
1.2.1 Pathogenese der PTLD .....	6
1.2.2 Epidemiologie der PTLD .....	8
1.2.3 Diagnose der PTLD .....	9
1.2.4 Therapie der PTLD.....	10
<b>1.3 Zielsetzung der Arbeit: .....</b>	<b>12</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Patienten.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>15</b>
2.2.1 Probenvorbereitung .....	15
2.2.2 DNA Isolation .....	15
2.2.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion in Echtzeit für die EBV-Lastmessung ..	16
im Plasma und PBMCs (TaqMan Technologie) .....	16
EBNA-1 DNA Assay: .....	19
2.2.4 RNA Isolation.....	21
2.2.5 Synthese von cDNA .....	22
2.2.6 Real-Time PCR für die qualitative Analyse der Expression von EBNA1, LP2,....	23
LMP1, LMP2a und ribosomaler RNA .....	23
<b>2.3 Statistische Analyse .....</b>	<b>24</b>
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Vergleich der Messergebnisse in Plasma und PBMC beider Patientengruppen</b>	<b>25</b>
<b>3.2 Vergleich der EBV-Last in PBMCs bei Patienten nach Herztransplantation mit</b>	
<b>und ohne PTLD.....</b>	<b>26</b>
<b>3.3 Vergleich der EBV-Last im Plasma bei Patienten nach Herztransplantation mit</b>	
<b>und ohne PTLD.....</b>	<b>27</b>

<b>3.4 EBV Last bei klinisch unauffälligen herztransplantierten Kindern .....</b>	<b>28</b>
<b>3.5 Verlauf der Viruslast in PBMCs bei PTLD-Patienten.....</b>	<b>30</b>
<b>3.6 Verlauf der Viruslast im Plasma bei PTLD-Patienten .....</b>	<b>35</b>
<b>3.7 Ergebnisse der PCR latenter Gene .....</b>	<b>37</b>
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1 Viruslastmessungen .....</b>	<b>40</b>
<b>4.2 Genexpression:.....</b>	<b>46</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>49</b>
<b>6 ANHANG.....</b>	<b>51</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>55</b>

## Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATCC	American Type Culture Collection
BL	Burkitt Lymphom
° C	Grad in Celsius
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Zytomegalievirus
C <sub>t</sub>	Threshold Cycle, Grenzwertzyklus
CRP	C-reaktives Protein
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr Virus
EBER	Epstein-Barr Virus <i>encoded RNA</i> , EBV kodierte RNA
EBNA	Epstein-Barr Virus <i>nuclear antigen</i> , EBV-nukleäres Antigen
EDTA	<u>E</u> thylend <u>a</u> min- <u>T</u> etraessigsäure
FRET	<i>fluorescence energy transfer</i> , Fluoreszenzenergietransfer
g	Gramm
HD	<i>Hodgkin disease</i> , Morbus Hodgkin
HSCT	<i>hematopoietic stemcell transplantation</i> , Hämatopoetische Stammzelltransplantation
IL-6	Interleukin-6
IM	Infektiöse Mononukleose
kbp	Kilobasenpaar
l	Liter
LMP	<i>Latent mebrane protein</i> , Latentes Membranprotein
m	Meter oder milli (10 <sup>-3</sup> )
max	Maximal
min	Minute
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
mRNA	Messenger RNA

μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )
NF-κB	Nuklear-Faktor κB, nukleärer Faktor Kappa B
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
n	Nano (10 <sup>-9</sup> )
NPC	Nasopharynx-Karzinom
NTC	<i>Non-Template Control</i> , Negativkontrolle
p	Piko (10 <sup>-12</sup> )
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> , mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PTLD	<i>post-transplantation lymphoproliferative disease</i> , Lymphoproliferative Erkrankung nach Transplantation
Q	Quencher
R	Reporter
rpm	Umdrehung pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
RT	reverse Transkriptase
RQ-PCR	<i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i> , quantitativePCR in Echtzeit
s	Sekunde
SCT	Stammzelltransplantation
SDS	Sequence Detection System
SOT	<i>solid organ transplantation</i> , Organtransplantation
Tab	Tabelle
Taq	DNA-abhängige DNA Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TNFR	Tumornekrose-Rezeptor-Familie
U	Enzym-Einheit (Units oder Unique)
XLPS	X-gebundenes lymphoproliferatives Syndrom

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Epstein-Barr-Virus

### 1.1.1 Die Entdeckung des Epstein-Barr Virus

1958 beschrieb der britische Chirurg Denis Burkitt ein B-Zell-Lymphom als häufigsten Tumor bei Kindern in Äquatorialafrika, wo die Malaria endemisch auftritt. Aufgrund dieser ungewöhnlichen Ätiologie vermutete schon Denis Burkitt eine infektiöse Ursache für dieses Lymphom, welches heute nach seinem Erstbeschreiber Burkitt-Lymphom (BL) genannt wird.

Im Jahre 1964 konnten M.A. Epstein, Y.M Barr und B.G. Achong diese damals strittige Hypothese bestätigen. Sie kultivierten BL-Zellen *in vitro* und fanden in diesen Kulturen elektronenmikroskopisch herpesvirusähnlichen Partikel, welche sich biologisch und antigenetisch von anderen Herpesviren abgrenzen ließen. Gertrude und Werner Henle identifizierten dieses Virus als neue Gattung und benannten es nach seinen Erstbeschreibern Epstein-Barr-Virus. Später konnte das Epstein-Barr-Virus (EBV) als Verursacher der infektiösen Mononukleose (IM) identifiziert werden. Diese war zwar schon im 19. Jahrhundert durch den deutschen Pädiater Emil Pfeiffer beschrieben, jedoch konnte das EBV als dessen Erreger erst identifiziert werden, als ein Mitarbeiter aus Werner Henle's Arbeitsgruppe, der an IM erkrankt war und zunächst seronegativ für EBV-Antikörper war, im Verlauf der Erkrankung eine Serokonversion zeigte. Durch nachfolgende epidemiologische Studien wurde nachgewiesen, dass weltweit die Durchseuchungsrate mit EBV bei Erwachsenen mehr als 90% beträgt (50).

### 1.1.2 Biologie des Epstein-Barr Virus

Das Epstein-Barr Virus ist ein ubiquitär verbreitetes, lymphotropes Virus, das den  $\gamma$ -Herpesviren zugeordnet wird. Es zeigt den für die Herpesviren klassischen Aufbau: Die Virionen haben einen Durchmesser von 120 bis 180nm und sind von einer Hüllmembran (envelope) umgeben. Diese Hüllmembran trägt Glykoproteinspikes, die eine wichtige



Rolle bei der Bindung an den Zellrezeptor, bei der Penetration und der Aufnahme in die Zielzelle spielen (100). Das ikosaedrische Kapsid der Herpesviren wird durch eine Tegumentschicht von der Hüllmembran getrennt (100). Im Inneren des Kapsids findet man das Virus-Core, eine fibrilläre Proteinmatrix mit der das Virus-Genom assoziiert ist (34, 127). Das in den Virionen vorhandene doppelsträngige EBV-DNA-Genom hat eine Länge von ca. 172kbp und codiert für etwa 100 Gene (2). Bislang konnten durch die Sequenzierung des Genoms zwei verschiedene EBV-Stämme identifiziert werden, die als Typ A und B, bzw. Typ 1 und 2, bezeichnet werden. Sie unterscheiden sich vor allem durch Polymorphismen in den Genen EBNA-2, EBNA-3a-c (30). Zudem differieren sie in ihrem geographischen Vorkommen, Gewebetropismus und biologischen Verhalten. EBV Typ A zeigt ein geographisch ubiquitäres Vorkommen, Typ B jedoch findet man vorwiegend in Afrika, wo es mit dem Vorkommen des BL assoziiert ist. Typ A hat die Fähigkeit sowohl Epithelzellen des Oropharynx, als auch periphere Blutlymphozyten zu infizieren, wohingegen man EBV Typ B nur selten in peripheren Blutzellen gesunder Virusträger findet. Obwohl immunsupprimierte Patienten eine deutlich höhere Inzidenz für Typ B zeigen, die unabhängig von der geographischen Zuordnung ist, findet man in 90% der lymphoproliferativen Erkrankungen nach Organtransplantation (PTLD) Viren vom Typ A. Daraus folgernd scheint die Aggressivität und Fähigkeit zu Proliferation beim Typ B geringer, gegenüber Typ A (30, 40).

### **1.1.3 EBV-assozierte Erkrankungen**

Die Primärinfektion im Säuglings- oder Kindesalter verläuft in der Regel asymptomatisch oder stellt sich ähnlich einem Infekt der oberen Atemwege dar. Kommt es jedoch zur Primärinfektion jenseits des 15. Lebensjahres findet man in bis zu 30-40% der Fälle das klinische Bild der infektiösen Mononukleose (IM), auch Pfeiffersches Drüsenfieber oder „kissing disease“ genannt (29, 113). In den vergangenen Jahren wurde das Epstein-Barr-Virus als Mitverursacher weiterer maligner Erkrankungen, wie z.B. Nasopharynxkarzinom (NPC), Hodgkin-Lymphom (HD), orale Haarleukoplakie und lymphoproliferative Erkrankung nach Organtransplantation (PTLD), identifiziert.

#### **1.1.4 Der Infektionsweg von EBV**

Die Übertragung von EBV erfolgt in erster Linie oral über Speichel (6). Eine mögliche Weitergabe des Virus über Blutprodukte oder Knochenmarkstransplantationen ist bis heute nicht auszuschließen (70, 93). Als Eintrittspforte für EBV dienen die Schleimhäute des Hals-Rachen-Raumes. Dort werden vor allem B-Lymphozyten infiziert, die sowohl als Ort der Latenz, als auch als Ort der lytischen Replikation angesehen werden (117). Die Internalisierung des Virus in B-Lymphozyten erfolgt durch die Interaktion des viralen Membranglykoproteins gp350/220 (80) mit dem B-Zell-Oberflächenantigen CD21 (CR2), dem physiologischen Rezeptor des Komplementfaktors C3d, welches zur rezeptorvermittelten Endozytose führt (28, 115). Ein dem CD21 ähnliches Molekül könnte für die Bindung an Epithelzellen verantwortlich sein, genaueres über die Infektion von Epithelzellen ist jedoch nicht bekannt (108, 132).

Nach der Internalisierung in die Wirtszelle kann das EBV in zwei verschiedene Infektionsphasen eintreten: die latente oder die lytische Phase (57).

In der latenten Phase entstehen keine infektiösen Viruspartikel. Das Virus verbleibt extrachromosomal als Episom in der Wirtszelle und wird zusammen mit dessen Genom repliziert und an die Tochterzellen weitergegeben.

In Abhängigkeit von der Expression elf verschiedener latenter Genprodukte werden verschiedene Typen der Latenz des EBV in infizierten Zellen unterschieden (57). (Tab. 1). Zu diesen latenten Genprodukten gehören sechs nukleäre Antigene (EBNA1, -2, -3A, -3B, -3C, -LP), drei latente Membranantigene (LMP1, -2A, -2B), sowie zwei untranslatierte Epstein-Barr kodierte RNA (EBER1 und -2).

Als Latenz-Typ 0 wird der vom Immunsystem unerkannte, virale Ruhezustand in nicht aktivierten B-Gedächtniszellen bezeichnet. Die virale Genexpression in diesen Zellen ist auf EBER1 und -2, LMP2A und vielleicht EBNA1 (13, 75) beschränkt.

Der Latenz-Typ I, die beim Burkitts-Lymphom gefunden wird, zeichnet sich durch die Expression von EBNA1 und EBER1 und -2 aus (59).

Die Latenz Typ II, die beim Nasopharynxkarzinom, Hodgkin-Lymphom und peripheren T-Zell-Lymphom vorliegt, ist durch die Expression von EBNA1, LMP1, -2A, -2B und die EBER gekennzeichnet.

Die Typ III-Latenz, die während der Erstinfektion, bei B-Lymphozyten in Zellkultur, bei Immunsuppression und bei PTLD unter Immunsuppression vorliegt, zeichnet sich durch die Expression sämtlicher elf latenter Genprodukte aus.

Durch die Expression dieser latenten Genprodukte kommt es zur Immortalisierung und somit zu unbegrenztem Wachstum der betroffenen B-Lymphozyten (63, 89).

<b>Latenz-Typ</b>	<b>EBNA -1</b>	<b>EBNA -2</b>	<b>EBNA -3</b>	<b>LMP-1</b>	<b>LMP-2A</b>	<b>EBER</b>	<b>Erkrankung</b>
Latenz-0	+/-	-	-	-	+	+	Gesunde, sero-positive Personen
Latenz-1	+	-	-	-	-	+	Burkitt's Lymphom
Latenz-2	+	-	-	+	+	+	Nasopharynx-Karzinom, Hodgkin-Erkrankung, peripheres T-Zell-Lymphom
Latenz-3	+	+	+	+	+	+	Lymphoproliferative Erkrankungen, XLPS, IM

Tab.: 1: Latenztypen des Epstein-Barr-Virus

In der lytischen Phase werden eine Vielzahl von infektiösen Viruspartikeln gebildet und nach Zerstörung der infizierten Zelle freigesetzt. Die lytische Replikation verläuft kaskadenartig und kann in die „unmittelbar frühe“ (*immediate-early*), die „frühe“ (*early*) und die „späte“ (*late*) Phase eingeteilt werden. In der ersten Phase erfolgt die Umstellung von der latenten Genexpression in die lytische Kaskade. In der folgenden Phase werden Genprodukte synthetisiert, die für die lytische DNA-Replikation notwendig sind, und in der abschließenden Phase wird die Virusreifung eingeleitet.

Nach der Erstinfektion kommt es zu einer lebenslangen Persistenz von EBV in B-Lymphozyten. Die Zahl dieser Zellen beläuft sich auf ca. 1-50 pro  $10^6$  B-Zellen und bleibt für den Patienten meist über Jahre hinweg konstant (124). Durch Reaktivierung können latent infizierte B-Zellen in den lytischen Replikationszyklus übergehen. Im peripheren Blut manifestiert sich die lytische Phase nur in Abwesenheit einer EBV-spezifischen Immunantwort. Genprodukte der lytischen Vermehrung können demnach nur bei Patienten mit IM, oder bei Immunsupprimierten, z.B. nach Organtransplantation nachgewiesen werden (90).

### **1.1.5 Wirkungen einiger Genprodukte**

Die meisten EBV-assoziierten Erkrankungen gehen mit einer sogenannten latenten Infektion des Virus einher. Während dieser latenten Infektionen ist eine eingeschränkte Transkription des Genoms zu verzeichnen. Die Gene, die während dieser Zeit exprimiert werden, werden als „latente Gene“ bezeichnet. Zu diesen latenten Genen gehören EBNA1, -2, -3A, -3B, -3C und -LP, LMP1, -2A, und 2B, sowie EBER1 und -2.

**EBNA1** ist in proliferierenden Zellen für die Replikation des viralen Genoms, sowie für die Verteilung der Episome auf die Tochterzellen von essentieller Bedeutung (57, 97). Das Protein zeichnet sich zudem durch eine Glycin-Alanin Wiederholungssequenz variabler Länge aus, die eine endogene Prozessierung und Präsentation des Proteins durch Antigen-präsentierende Zellen verhindern. Somit entgehen diese Zellen, die als einziges Protein EBNA1 ausprägen (Latenz I), der Immunabwehr durch zytotoxische T-Lymphozyten (63). Weiterhin werden ihm onkogene Eigenschaften zugeschrieben: in transgenen Mäusen induziert die Expression von EBNA1 monoklonale B-Zellneoplasien. (128). Durch Promotoraktivierung hat es die Möglichkeit seine eigene Expression zu aktivieren. EBNA1 ist das einzige EBV-Protein, welches in jeder EBV-positiven Zelle exprimiert wird.

**EBNA2** für die Transformation von B-Lymphozyten unerlässlich. Durch seine regulatorischen Eigenschaften, führt die Expression von EBNA2 zur Transaktivierung von zellulären (CD23, CD21) (18) und viralen Genen (LMP1, LMP2A, EBNA3A-3C) (27, 118). Die Aktivierung von LMP1 stellt einen entscheidenden Schritt für die Immortalisierung der Wirtszelle dar (55). Zudem bewirkt EBNA2 zusammen mit EBNA5 einen Wechsel der Zelle von der G0 in die G1-Phase des Zellzyklus (107).

Das wichtigste Protein für die Transformation von B-Zellen scheint **LMP1** zu sein (56). Es war das erste EBV-Protein, für welches diese transformierenden Eigenschaften nachgewiesen werden konnten (125). Es zeigt auf molekularer Ebene Ähnlichkeiten mit Mitgliedern der Tumornekrose-Rezeptor-Familie (TNFR), zu denen neben dem TNF-Rezeptor selber unter anderem auch das CD40 Molekül gehört. Somit kann LMP1 mit TNFR assoziierten Faktoren interagieren. Diese Interaktion ermöglicht dem Epstein-Barr Virus durch Aktivierung des Nuclear Faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), B-Zellen und auch Epithelzellen

zur Proliferation zu treiben (65, 126). Zudem besitzt LMP1 die Fähigkeit, infizierte Zellen durch die Induktion der anti-apoptotischen Proteine bcl-2 und A20 vor Apoptose zu schützen (31, 49).

**LMP-2A** wird gemeinsam mit LMP-2B von einem Gen codiert und unterscheidet sich von diesem lediglich im ersten Exon, welches LMP-2B fehlt. In ruhenden B-Zellen hemmt LMP-2A die Antigenrezeptor-vermittelte Aktivierung der Zellen (32). Dadurch wird eine Aktivierung der latenten oder auch der lytischen Replikation vermieden, was dazu beiträgt, die Latenz zu stabilisieren und die Immunerkennung infizierter Zellen im Körper zu verhindern (33). In transgenen Mäuse konnte gezeigt werden, dass LMP-2A, obwohl hierfür bislang keine onkogenen Eigenschaften nachgewiesen werden konnten, Überlebenssignale für B-Zellen bieten kann, auch wenn diese keinen B-Zell-Rezeptor exprimieren (7). Inwieweit dies auf EBV-Infektionen beim Menschen übertragen werden kann, bleibt abzuwarten.

**EBER1** und **EBER2** sind kleine Epstein-Barr kodierte RNAs, die nicht translatiert werden. Die Funktion dieser Transkripte *in vivo* ist bis heute noch unklar. Es wird angenommen, dass sie, neben LMP1, die Expression von bcl-2 induzieren können und dadurch die infizierte Zelle vor Apoptose schützen (15). Interessant ist, dass sie in jeder EBV-infizierten Zellen nachgewiesen werden können.

## 1.2 Lymphoproliferative Erkrankungen nach Organtransplantation

### 1.2.1 Pathogenese der PTLD

PTLD wurden bereits 1968 beschrieben und damals als „reticulum cell sarcoma“ oder Pseudolymphome bezeichnet (36, 110). Heute bezeichnet PTLD eine klinisch und histologisch heterogene Gruppe von Erkrankungen, die in den allermeisten Fällen mit dem Epstein-Barr-Virus assoziiert sind. Das Virus hat abhängig von Stammzell- oder Organtransplantation (SOT) unterschiedlichen Ursprung. Nach Stammzelltransplantation (SCT) stammt das Virus meist vom Spender (133), nach Organtransplantation jedoch meist vom Empfänger (11).

Der genaue Mechanismus der Entstehung von mit EBV-assoziierten Neoplasien nach Transplantation ist noch nicht vollständig bekannt. Aufgrund der iatrogenen Immunsuppression bei Transplantierten kommt es zu einer Unausgeglichenheit zwischen EBV-infizierten Zellen und EBV-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs). Die verminderte T-Zell-Antwort erhöht das Risiko einer unkontrollierten Proliferation EBV-infizierter B-Zellen (19, 98), oder in seltenen Fällen von T-Zellen oder natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (24, 53).

Ein weiterer entscheidender Faktor für die Entwicklung einer PTLD scheint die Expression viraler Gene zu sein. Die infizierten Zellen zeigen im Allgemeinen das virale Latenzstadium III, wobei jedoch einzelne Zellen in den Tumoren ein anderes Genexpressionsmuster zeigen können. Die exprimierten Gene führen unter anderem zur ungehemmten Proliferation und zur Immortalisierung der B-Zellen.

Im Gegensatz zu anderen lymphatischen Tumoren sind chromosomale Veränderungen nur in einzelnen Fällen von PTLD zu finden. Hierzu gehören Mutationen in den Onkogenen *c-myc* und *N-ras*, sowie im Tumorsuppressorgen *p53* (12, 60, 76). Neuere Studien beschreiben in ca. 40% der Erkrankungen Punktmutationen oder Deletionen im Promotorbereich des *BCL-6*-Gens, die anscheinend mit einer schlechteren Prognose einhergehen (10, 84).

Die expandierende Zellpopulation ist zunächst eine reversible polymorphe, polyklonale Lymphoproliferation, welche sich ohne Therapie zu einem monoklonalen malignen Lymphom entwickeln kann (12, 47, 78). Dieses Ereignis ist jedoch auch bei Immunsupprimierten selten. So entwickeln sich nur ein oder zwei der Millionen infizierten B-Zellen zu Tumoren (116). Seit Entdeckung der PTLD hat es verschiedene Versuche gegeben, ein Klassifikationssystem zu entwickeln. Ein heute oft verwendetes System ist das der Society of Hematopathology von 1996, das hyperplastische, polymorphe, lymphomatöse oder monomorphe PTLDs, sowie „andere“ unterscheidet (Tab. 2) (79).

Einteilung der histologischen Klassifikationen	
<b>1. Hyperplastische PTLD (“early lesions”)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Reaktive plasmazytische Hyperplasie</li> <li>Infektiöse Mononukleose</li> <li>Atypische lymphoide Hyperplasie mit Erhalt der Lymphknotenarchitektur</li> </ul>
<b>2. Polymorphe PTLD</b>	
<b>3. Lymphomatöse PTLD (“monomorphe PTLD”)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>B-Zell Lymphom                             <ul style="list-style-type: none"> <li>Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom (immunoblastisches, zentroblastisches, anaplastisches)</li> <li>Burkitt / Burkitt-like Lymphom</li> <li>MALT-Lymphom</li> </ul> </li> <li>T-Zell Lymphom                             <ul style="list-style-type: none"> <li>Peripheres pleomorphes T-Zell-Lymphom</li> <li>Anaplastisches großzelliges T-Zell-Lymphom (T oder Null-Zell-Lymphom)</li> <li>Gamma-/Delta-T-Zell-Lymphom mit Hepatosplenomegalie</li> <li>Andere (z.B. NK-Zell-Lymphom)</li> </ul> </li> </ul>
<b>4. Andere</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Plasmozytom</li> <li>Multiples Myelom</li> <li>Hodgkin-like Lymphome</li> </ul>

Tab. 2: Einteilung der histologischen Klassifikationen der PTLDs nach Nalesnik (79)

### 1.2.2 Epidemiologie der PTLD

Die Angaben über die Inzidenz von PTLD schwanken von 1% bis über 20% (78). Bei Kindern, die generell häufiger an einer PTLD erkranken als Erwachsene, findet man in Abhängigkeit davon, welches Organ transplantiert wurde, unterschiedliche Inzidenzen: bis zu 33% für kombinierte Leber-Nieren-, 15% für Herz-, 10% für Leber-, 6,4% für Lungen- und 1,2% für Nierentransplantierte (1, 16, 26). Für die Entwicklung einer PTLD konnten verschiedene Risikofaktoren identifiziert werden. Als entscheidender Risikofaktor gilt die primäre EBV-Infektion nach Organ- oder Stammzelltransplantation - in bis zu 90% der PTLD Fälle ist diese nachweisbar (51, 87). Hinzu kommen geringes Alter des Patienten, Art und Intensität der Immunsuppression, sowie primäre Infektion mit dem Zytomegalievirus (CMV) (69, 96, 109, 111, 114). Nach der Einführung von Cyclosporin A und Tacrolimus ließ sich zunächst ein Anstieg der Inzidenz verzeichnen (96, 111). Neuere Studien konnten jedoch ein nur kaum erhöhtes Risiko bei Anwendung dieser Substanzen belegen (106). Ein nachweislich signifikant erhöhtes Risiko für die Entstehung einer PTLD findet man jedoch bei Einsatz von OKT3, einem murinen monoklonaler Antikörper, der gegen das CD3-Oberflächenantigen gerichtet ist (114). Dass die Erkrankung eine schwere

Komplikation nach Transplantation sowohl bei Kindern, als auch bei Erwachsenen darstellt, zeigen die Angaben der Mortalität, die von 25% bis über 80% variieren (16, 20, 86).

### **1.2.3 Diagnose der PTLD**

Aufgrund der hohen Mortalität von PTLD ist eine sichere und frühzeitige Diagnose bei Verdacht auf eine Erkrankung aus diesem Krankheitsspektrum sehr wichtig. Erschwert wird dieses durch die Tatsache, dass das klinische Bild zum Teil sehr unterschiedlich und variabel ist. Es kann sich als IM-ähnliche Erkrankung mit Fieber und Lymphadenopathie sowie Abgeschlagenheit und Leukopenie präsentieren. Auch asymptomatische Formen kommen vor. Hinzu kommt die Problematik der Differenzierung zu einer Organabstoßungsreaktion (94, 95). Diese Differenzierung von PTLD und Abstoßungsreaktion ist aufgrund des unterschiedlichen therapeutischen Vorgehens von entscheidender Bedeutung. Als Goldstandard für die Diagnose einer lymphoproliferativen Erkrankung nach Organtransplantation gilt noch immer die histopathologische Beurteilung einer Gewebebiopsie (48, 79, 86). Hierbei sollte die Exzision und anschließende Untersuchung von betroffenen Lymphknoten oder Tumormaterial angestrebt werden. Eine Nadelbiopsie sollte nur durchgeführt werden, wenn dies die einzige Möglichkeit zur Materialgewinnung ist. In den vergangenen Jahren wurde immer wieder versucht, diagnostische Verfahren zur Sicherung einer PTLD zu entwickeln, die weniger invasiv sind. Dabei erwiesen sich verschiedene serologische Methoden aufgrund der immunologischen Dysfunktion durch Immunsuppression nach Transplantation sowie zytologische Untersuchungen als ungeeignet (35, 41, 92, 122). Die in-situ-Hybridisierung von EBER RNAs wird häufig angewendet, um die Beteiligung des Epstein-Barr Virus nachzuweisen (47). Studien der letzten Jahre zeigen vielversprechende Ergebnisse bezüglich der Korrelation zwischen der Viruslast und der Entwicklung einer PTLD (37, 52, 68). Deswegen ist die Viruslastmessung eine häufig angewendete Methode zur Überwachung von immunsupprimierten Patienten, z.B. nach vorangegangener Transplantation (38). Allerdings gibt es bis heute kein standardisiertes Verfahren, so dass die Ergebnisse nur unzureichend vergleichbar sind. So bestehen Unterschiede in Material und Methoden: PBMCs (54, 58, 72, 99) vs. Vollblut (70, 72, 102, 112) vs. Serum (62, 66) oder Plasma (73, 121, 129) sowie quantitative (3, 54, 58, 72, 81) versus quantitativ-



kompetitive PCR Verfahren (76, 102, 112, 130). Die RQ-PCR scheint hierbei das zur Zeit geeignetste Verfahren zu sein, da sie gleichzeitig sensitiv, präzise und reproduzierbar ist und zudem auch noch in der Routinediagnostik angewendet werden könnte (14). Weitere Unklarheiten bestehen über einen Grenzwert der Viruslast, ab dem ein so hohes Risiko für die Entwicklung einer PTLD angenommen wird, dass dies prophylaktische oder therapeutische Konsequenzen nach sich ziehen würde.

### **1.2.4 Therapie der PTLD**

Aufgrund der niedrigen Prävalenz von PTLDs sind bis dato noch keine randomisierten und kontrollierten Therapiestudien mit Einschluss ausreichend großer Patientenkollektive durchgeführt worden. Somit gibt es zur Zeit kein einheitliches Therapieschema. In den letzten Jahren wurden verschiedene Behandlungsverfahren entwickelt, die zum Teil sehr erfolgsversprechend erscheinen. Als Mittel der ersten Wahl bei allen Patienten mit PTLD gilt die Reduktion der immunsuppressiven Therapie. In 23% bis 50% der Fälle, in denen die Immunsuppression reduziert oder ganz ausgesetzt wurde, konnte ein spontaner Rückgang von sowohl monoklonalen als auch polyklonalen Läsionen beobachtet werden (4, 76, 88, 111). Jedoch stieg hierbei gleichzeitig das Risiko für eine Abstoßungsreaktion. Der Erfolg einer antiviralen Therapie mit z.B. Aciclovir oder Ganciclovir scheint zweifelhaft (111), da diese Substanzen zwar auf Viren der lytischen, nicht jedoch der latenten Infektion wirken (67), wie sie in 90% der EBV-assoziierten PTLD Fälle vorzufinden sind (21).

Sowohl eine chirurgische Entfernung und Radiatio bei lokalisierten Tumoren sowie Chemotherapie kann nach initialer Reduktion der Immunsuppression in Erwägung gezogen werden (20, 77, 112).

Eher experimentellen Charakter haben Behandlungsverfahren mit Einsatz von Interferon- $\alpha$  oder monoklonalen anti-IL-6-Antikörpern. Wegen der Beteiligung von IL-6 in der Entstehung von PTLD, wird diese Anwendung indessen als vielversprechende Therapieoption angesehen (39, 43). Nach Einsatz von Interferon- $\alpha$  im Therapieverfahren konnte in einer Studie eine komplette Remission bei 50% der Betroffenen beobachtet werden (22).

Eine wichtige Rolle in der Therapie von PTLD nach HSCT nimmt die Gabe von EBV-spezifische zytotoxische Donor-T-Zellen ein, die bereits seit längerer Zeit etabliert ist (51,

101). Auch nach SOT kann mittlerweile auf diese Behandlungsmethode zurückgegriffen werden. Die EBV-spezifische Immunantwort von T-Killer-Zellen kann durch die Gabe von *in vitro* angezüchteten, autologen CTLs wieder hergestellt werden (23, 45). In verschiedenen Studien konnte auch die Effizienz prophylaktischer CTL-Gaben zur Prävention von PTLD nachgewiesen werden (16, 42, 105). Als alternative Therapie von PTLD mit zunehmenden Stellenwert werden monoklonale Antikörper angesehen, die gegen B-Zell Epitope gerichtet sind. Besonders erfolgsversprechend scheint der Einsatz eines monoklonalen Antikörpers, der gegen CD20 gerichtet ist (Rituximab). Rituximab führt zur generellen Depletion von B-Zellen und somit auch zur Eliminierung von EBV-infizierten oder transformierten B-Lymphozyten. Erfolgreiche Behandlungen konnten sowohl bei Patienten nach HSCT, als auch nach SOT verzeichnet werden (25, 61, 74, 133), wobei die eine komplette Regression in bis zu 80% erreicht werden kann (61, 74). Nachteilig bei der Anwendung von Rituximab ist die Tatsache, dass die Blut-Hirn-Schranke nicht permeabel für diese Substanz ist und damit den Einsatz bei PTLD des ZNS limitiert (46).

Aufgrund der hohen Mortalität von an PTLD Erkrankten gilt für alle Therapiestrategien, dass eine frühzeitige, eventuell schon präventive Behandlung notwendig ist. Dies unterstreicht die herausragende Rolle des diagnostischen Monitorings, um eine frühzeitige Diagnosestellung zu ermöglichen.

### **1.3 Zielsetzung der Arbeit:**

Die EBV-Lastmessung im peripheren Blut organtransplantierte pädiatrischer Patienten wird, wie vorangehend erläutert, zum Monitoring dieser Patienten angewendet. Es ist eine sensitive, jedoch wenig spezifische Methode, um EBV induzierte Lymphoproliferationen zu erkennen.

Ziel dieser Arbeit ist das Genexpressionsmuster von EBV zusätzlich zur Viruslastmessung zu untersuchen, um so sowohl Hochrisikopatienten erkennen zu können, als auch eine möglichst frühe Diagnose einer PTLD stellen zu können, die eine erfolgreichere Therapie ermöglichen würde. Es gilt also, die Hypothesen zu überprüfen, ob

1. EBV-Viruslast-Grenzwerte, die für erwachsene Patienten identifiziert wurden, auch für organtransplantierte pädiatrische Patienten gelten;
2. Hochrisikopatienten am Genexpressionsmuster erkannt werden können;
3. ein spezifisches Genexpressionsmuster existiert, das die Diagnose einer PTLD erlaubt;
4. eine Korrelation zwischen der EBV-Viruslast und einem Genexpressionsmusters besteht.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Patienten**

157 Proben von 21 herztransplantierten Kindern und Jugendlichen standen uns für die Untersuchung unserer Fragestellung zur Verfügung. Diese Proben wurden von Juni 2002 bis Januar 2006 in der Abteilung für Kinderkardiologie und angeborene Herzfehler des Kinderherzzentrums des Klinikums der Justus-Liebig-Universität in Gießen entnommen. Vier der 21 Patienten entwickelten während des Untersuchungszeitraumes eine PTLD, die histologisch gesichert wurde.

#### Herztransplantierte, sonst gesunde, immunsupprimierte Kinder:

Diese Gruppe bestand aus 17 Kindern (12 Jungen und 5 Mädchen), die zum Zeitpunkt der ersten Probengewinnung 1,3 bis 19,6 Jahren (Median 8,4 Jahre) alt waren. Pro Patient wurden 3 bis 7 Proben (Median 4 Proben), die in einem Zeitraum von 7-21 Monaten entnommen wurden, untersucht.

Zum Zeitpunkt der Herztransplantation waren 14 der 17 Patienten 1 Monat bis 5,4 Jahre (Median: 3 Monate) alt und zum Zeitpunkt der Untersuchung waren seit der Transplantation 10 bis 173 Monate (Median 74 Monate) vergangen. Gründe für die Transplantation waren ein hypoplastisches Linksherzsyndrom oder eine dilatative Kardiomyopathie sowie sonstige Erkrankungen in 3 Fällen.

Die immunsuppressive Therapie während des Zeitraumes unserer Untersuchung bestand bei einem Patienten aus einer Monotherapie mit Ciclosporin A. Bei 6 Patienten kam eine Kombinationstherapie mit Ciclosporin A und Mycophenolatmofetil sowie bei einer weiteren Person aus Tacrolimus (FK506) und Mycophenolatofetil zum Einsatz. Sechs aus dieser Patientengruppe erhielten eine Tripeltherapie aus Ciclosporin A, Azathioprin und Steroiden.

Bei 3 Patienten dieser Gruppe waren Informationen über Zeitpunkt der Transplantation, Grunderkrankung, sowie immunsuppressive Therapie nicht verfügbar.

Kinder mit histologisch gesicherter PTLD:

Diese 4 Patienten (3 Jungen, 1 Mädchen) waren zum Zeitpunkt bei dem ihre Daten in die Studie einfließen 3,3 bis 13,4 Jahre (Median 7,6 Jahre) alt. Von ihnen standen 11 bis 29 Proben (Median: 19 Proben) aus einem Zeitraum von 18 bis 46 Monaten (Median 23 Monate) zur Verfügung. 3 der 4 Patienten mit histologisch gesicherter PTLD waren zum Zeitpunkt der Transplantation 5 Monate bis 2,8 Jahre (Median 9 Monate) alt und seit der Transplantation waren 7 bis 78 Monate (Median 72 Monate) vergangen. Bei jedem dieser 3 Patienten erfolgte die Herztransplantation aufgrund einer dilatativen Kardiomyopathie. Die immunsuppressive Therapie während des Zeitraumes der Untersuchungen bestand bei einem Patienten aus einer Monotherapie mit Ciclosporin A, ein Patient bekam zusätzlich Mycophenolatmofetil. Und ein weiterer Patient erhielt eine Kombinationstherapie aus Tacrolimus (FK506) und Mycophenolatmofetil.

Bei einem Patienten dieser Gruppe standen uns keine Informationen über den Zeitpunkt der Transplantation sowie deren Grund und über die immunsuppressive Therapie zur Verfügung.

	<b>Gesunde immunsupprimierte Patienten (n=17)</b>	<b>Patienten mit PTLD (n = 4)</b>
<b>Alter</b>	1,3 -19,6 Jahre (Median: 8,4 Jahre)	3,3 – 13,4 Jahre (Median: 7,6 Jahre)
<b>Geschlecht</b>		
männlich	12	3
weiblich	5	1
<b>Untersuchungszeitraum</b>	7 - 21 Monate (Median: 15 Monate)	18 – 46 Monate (Median: 23 Monate)
	n = 14	n = 3
<b>Zeit bis zur ersten Untersuchung nach Transplantation</b>	10 – 173 Monate (Median: 74 Monate)	7 – 78 Monate (Median: 72 Monate)
<b>Alter bei Transplantation</b>	1 Monat – 5,4 Jahre (Median: 5 Monate)	5 Monate – 2,8 Jahre (Median: 9 Monate)
<b>Grunderkrankung</b>		
Hypoplastisches Linksherzsyndrom	9	-
Dilatative Kardiomyopathie	2	3
Sonstige	3	-
<b>Immunsuppressive Therapie</b>		
Ciclosporin A Monotherapie	1	1
Ciclosporin + Mycophenolatmofetil	6	1
Ciclosporin + Azathioprin + Steroide	6	-
Tacrolimus + Mycophenolatmofetil	1	1

Tab. 3: Kenndaten der untersuchten Patienten

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Probenvorbereitung**

Pro Patient haben wir aus den jeweiligen Kliniken 5-10ml ungekühltes EDTA-Blut per Post zugesandt bekommen. Bei Patienten aus der eigenen Klinik wurde das angenommene Blut mit der Hauspost verschickt. Aus diesen Proben wurden – wenn ausreichend Material vorhanden war – sowohl Plasma, als auch PBMCs gewonnen.

Zunächst wurde das Blut für 10min bei 2000U/min (881g) zentrifugiert. Das so gewonnene Plasma wurde abpipetiert und in Portionen zu je 1ml bis zur weiteren Verarbeitung bei –80°C eingefroren.

Unter Zuhilfenahme der Ficoll-Separationslösung haben wir eine Standard-Dichte-Zentrifugation des verbliebenen Blutes durchgeführt. Somit konnten wir aus dem Restplasma und den zellulären Blutbestandteilen mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) isolieren. Anschließend wurde das Isolat zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und in zwei Teile geteilt, in zwei Eppendorfgefäße überführt. Der Teil der Probe für die DNA Isolation wurde pelletiert und ohne Pufferzusatz bei –80°C eingefroren. Der zweite, gleichgroße Teil der Probe für die RNA Isolation wurde pelletiert und in RLT Puffer überführt. Auch die Lagerung dieser Probe erfolgte bei –80°C. Der RLT Puffer wurde zum Aufschließen der Zellen hinzugegeben. Anschließend erfolgte das Mischen auf dem Vortex. Der RLT Puffer enthält ein stark denaturierendes Guanidinisothiocyanat, durch das RNasen sofort effizient inaktiviert werden, so dass die Isolierung von intakter RNA gewährleistet wird.

### **2.2.2 DNA Isolation**

Die DNA-Isolation aus 1ml Plasma, bzw. PBMCs, die in 1ml PBS aufgeschwemmt wurden, erfolgte mit Hilfe des QIAamp DNA Blood Midi Kits auf eine vom Hersteller empfohlene Weise in mitgelieferten Zentrifugationsröhrchen. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte der Isolation kurz skizziert. Die Schritte gelten sowohl für das Plasma als auch für die PBMCs.

1. Zugabe der vorgesehenen Protease zur Lysierung und Inkubation
2. Zugabe von Ethanol als Lösungsmittel

3. Pipettieren der Lösung auf die Filter der mitgelieferten Zentrifugationsröhrchen und anschließende Zentrifugation.
4. Das entstandene Filtrat wird verworfen, die im Filter verbliebene DNA zweimal mit verschiedenen Puffern gespült
5. Überführen des Filters in ein neues Röhrchen und Herauslösen der DNA aus dem Filter mit einem Elutionspuffer
6. Eluate von Plasma und PBMCs in Eppendorfgefäße überführen

Aufgrund unterschiedlich eingesetzter Volumina des Elutionspuffers bei der Isolation aus Plasma, bzw. PBMCs betrug das Eluationsvolumen im Falle des Plasmas 200 $\mu$ l. Im Falle der PBMCs 400 $\mu$ l. Dies ist damit zu begründen, dass trotz der im Plasma geringeren DNA-Konzentration eine möglichst hohe Konzentration im Eluat erreicht werden sollte. Bei einem Ausgangsvolumen von 1ml Plasma, liegt also eine Erhöhung der Konzentration um das 5-fache vor.

Im Gegensatz hierzu wurde zur Auswaschung der DNA, die wir aus PBMCs isoliert haben, 400 $\mu$ l Elutionspuffer eingesetzt. 50 $\mu$ l der hierdurch erhaltenen Lösung wurden zur Bestimmung der DNA-Konzentration und eventueller Verunreinigung photometrisch gemessen. Überschritt die Konzentration von DNA in den PBMC Proben einen Wert von 50 $\mu$ g/ml, wurde diese unter Verwendung von destilliertem Wasser auf 50 $\mu$ g/ml verdünnt.

### **2.2.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion in Echtzeit für die EBV-Lastmessung im Plasma und PBMCs (TaqMan Technologie)**

Die hier angewandte quantitative Polymerase-Kettenreaktion in Echtzeit (quantitative, real-time polymerase chain reaction; RQ-PCR) ermöglicht die Quantifizierung von PCR Produkten mittels Generierung eines fluoreszierenden Signals während des PCR-Prozesses. So werden post-PCR Arbeitsschritte, wie z.B. Gelelektrophorese oder Southern blotting und damit verbundene Kontamination, die bei herkömmlichen PCR Verfahren auf die Amplifizierung folgen, ausgeschaltet.

Bei den TaqMan-Assays wird neben den bei herkömmlichen PCRs eingesetzten Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs), dem Primerpaar und der Taq-Polymerase ein sequenzspezifisches Oligonukleotid, das als Sonde bezeichnet wird, im Überschuss vor

Beginn der PCR zugegeben. Diese Sonde ist homolog zu einer zwischen den Primerbindungsstellen liegenden Region und wird somit an diesen Bereich gebunden. An dem 5'-Ende besitzt die Sonde einen fluoreszierenden Reporter Farbstoff (R) und am 3'-Ende einen Quencher Farbstoff (Q). Als Reporterfarbstoffe verwendet werden FAM (6-carboxy-fluorescein) und VIC, als Quencher TAMRA (6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin). Diese Farbstoffe besitzen ein Maximum der Fluoreszenzemission bei einer für sie spezifischen Wellenlänge:

FAM:	$\lambda_{\max}$ : 518nm
VIC:	$\lambda_{\max}$ : 552nm
TAMRA:	$\lambda_{\max}$ : 582nm

Solange die Moleküle des Reporters und Quenchers in räumlicher Nähe an die sequenzspezifische Region des DNA-Stranges gebunden sind, unterdrückt der Quencher die Fluoreszenzemission des Reporters, welches als fluorescence resonance energy transfer (FRET) bezeichnet wird (9). Wie bei herkömmlichen PCR-Verfahren kann man auch bei RQ-PCR Verfahren 3 verschiedene Phasen unterscheiden. Zunächst wird der Reaktionsansatz erhitzt und damit die doppelsträngige DNA denaturiert. Darauf folgt die Abkühlung, damit die Primer an die DNA hybridisieren können. Dann verlängert die DNA-Polymerase die Primer durch Anhängen von Nukleotiden. Damit ist der gewünschte DNA-Abschnitt verdoppelt und ein neuer Zyklus kann beginnen. Bei der von uns verwendeten RQ-PCR mit TaqMan Technologie wird die Sonde während der DNA-Synthesephase durch die 5'-3' Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase vom DNA-Strang abgespalten, beginnend am 5'-Ende, so dass die räumliche Nähe vom 5'-Reporter zum Quencher am 3'-Ende aufgehoben wird. Durch Abspaltung der Sonde durch die DNA-Polymerase können die Primer bis zum Ende des Proben Stranges verlängert werden, so dass der PCR Prozess nicht behindert wird. Das Fluoreszenzsignal, generiert vom Reporter, wird nun nicht mehr durch den Quencher unterdrückt, so dass dieses Signal vom ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (SDS) registriert und gegen den ebenfalls im Ansatz enthaltenen Referenzfarbstoff ROX abgeglichen werden kann. Der Referenzfarbstoff bietet eine interne Referenz, so dass das Signal des Reporterfarbstoffes normalisiert werden kann.



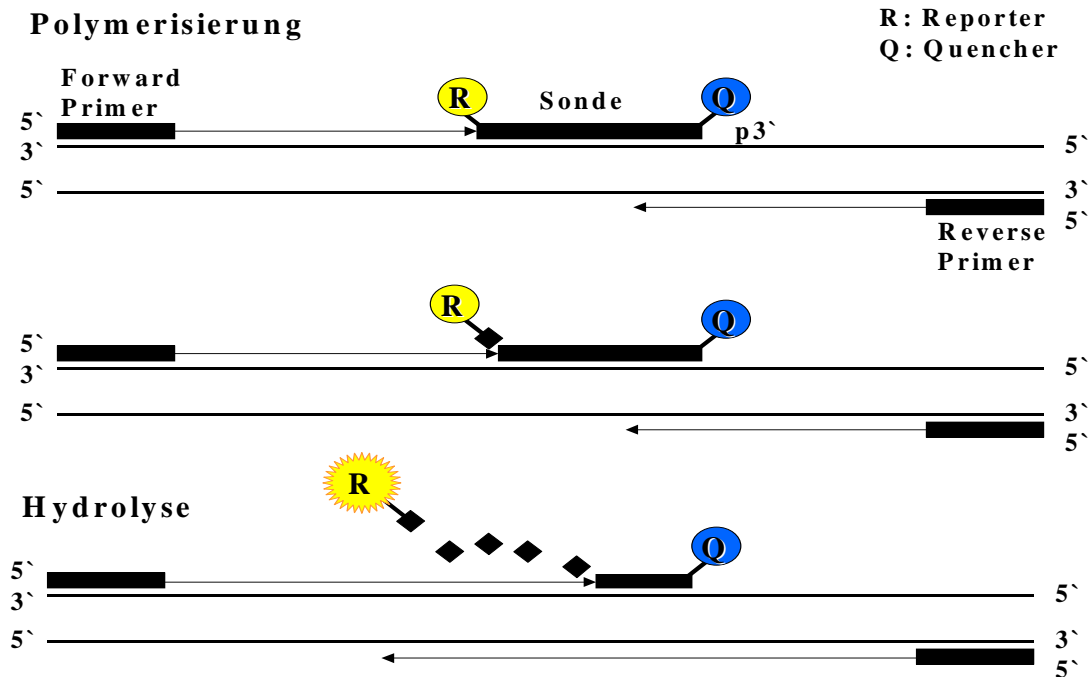


Abb. 1: Biochemisches Prinzip der Real-Time PCR ( nach Wagner (123))

Ein Anstieg der Intensität der Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes ist proportional zur Menge der amplifizierten DNA. Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgt alle 7 Sekunden durch das SDS. Hierdurch entsteht eine Amplifikationskurve der PCR mit einer exponentiellen Phase und einer Plateauphase. Während der exponentiellen Phase überschreitet die Intensität des Fluoreszenzsignals einen Schwellenwert, was bei den Messungen festgehalten wird. Diesen Zyklus des PCR-Prozesses bezeichnet man als Thresholdcycle,  $C_t$ . Der  $C_t$ -Wert ist umgekehrt proportional zu der Konzentration der Zielsequenz. Je höher die Konzentration des zu bestimmenden DNA-Abschnittes, desto niedriger ist die Anzahl der PCR Zyklen, die gebraucht wurde, um den Schwellenwert zu erreichen. Wird ein Standard, mit zuvor bekannter DNA-Konzentration in verschiedenen Verdünnungen mitgeführt, lässt sich unter Zuhilfenahme der hierfür ermittelten  $C_t$ -Werte eine Standardkurve erstellen. Auf dieser Kurve kann dann bei bekanntem  $C_t$ -Wert die vorliegende DNA-Konzentration abgelesen werden.

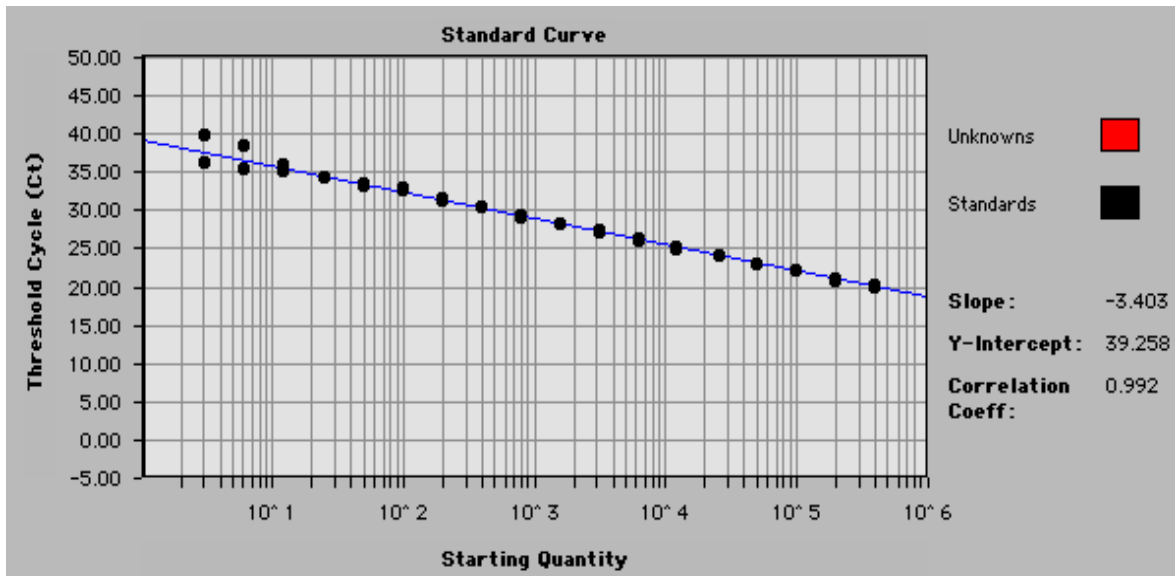


Abb. 2: C<sub>t</sub>-Werte der Amplifikation einer Titrationsreihe (1:2-Verdünnung) von Namalwa-Zellkultur-DNA, Nachweis von EBNA1

Unter Anwendung dieses Verfahrens haben wir für die Bestimmung der EBV-Genomlast einen PCR Ansatz durchgeführt, bei dem die Bam HI-K (EBNA1)-Regionen des EBV Genoms amplifiziert wurden.

#### EBNA-1 DNA Assay:

Das Epstein-Barr spezifische nukleäre Antigen 1 (EBNA1) wird von der BAM HI-K-Region des EBV-Genoms kodiert. Bei diesem Ansatz handelt es sich um eine Duplex PCR, d.h. ein zweiter Genabschnitt neben dem für EBNA1 wird im selben Ansatz als interne positive Kontrolle mitgeführt und infolge dessen auch mit amplifiziert. Hierfür müssen die jeweils spezifischen Sonden mit Reporterfarbstoffen versehen werden, die sich in der Wellenlänge ihrer Fluoreszenzemissions-Maxima unterscheiden. Als Positivkontrolle haben wir eine Region des humanen C-reaktiven Proteins (CRP) gewählt. Die Sonden für die CRP Region war mit FAM, die für die BAM HI-K Region mit VIC als Reporterfarbstoff versehen.

Zunächst wurde die bei -80°C eingefrorene, aus PBMCs und Plasma isolierte DNA bei Raumtemperatur aufgetaut. Währenddessen ist die für die Anzahl der zu messenden Proben entsprechende Menge an benötigten TaqMan Universal Master Mix, Primern, Sonden und Wasser berechnet worden. Die entsprechenden Mengen dieser Lösungen wurden in ein steriles Reaktionsgefäß pipettiert und vermischt.

Um eventuelle Kontamination nachweisen zu können, sind in jedem PCR-Lauf jeweils 4 Reaktionsgefäße der Titerplatte mit Non Template Controls (NTC) bestückt worden. Diese enthielten als Negativkontrollen anstelle der DNA destilliertes Wasser, so dass sich in diesen Reaktionsgefäßen nach Beendigung des PCR Prozesses nur DNA nachweisen ließ, wenn diese verunreinigt waren. Von jeder Probe wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Neben den Proben und Negativkontrollen ist in jedem PCR-Ansatz eine Standardreihe mitgeführt worden. Dieser Standard zur Quantifizierung der EBV-DNA war die EBV-positive Zelllinie Namalwa aus Burkitt-Lymphom-Zellen (American Type Culture Collection [ATCC] CRL-1432). Namalwa-Zellen enthalten konstant zwei integrierte EBV Kopien pro zellulärem Genom. Dies ist näherungsweise äquivalent zu einer EBV Kopie pro 3,3pg Namalwa-DNA. Daher ist es möglich, die Zahl der EBV-Genom Kopien in den Proben mit der Menge der eingesetzten Namalwa-DNA zu berechnen. Um eine Standardkurve erstellen zu können, auf der die  $C_t$ -Werte gegen die Menge DNA aus Namalwa-Zellen aufgetragen sind, haben wir jedem PCR-Lauf eine Titrationsreihe aus 7 Namalwa-Standards mit unterschiedlicher Anzahl an EBV-Genomkopien (8 Kopien, 32 Kopien, 128 Kopien, 512 Kopien, 2048 Kopien, 8192 Kopien, 32768 Kopien) jeweils in Doppelbestimmungen mitgeführt. Auf der hieraus entstandenen Standardkurve konnte man die Anzahl der in den Proben enthaltenen EBV-Genomkopien anhand der ermittelten  $C_t$ -Werte ablesen. (*Einfachansatz zur EBNA-1 Bestimmung siehe Anhang*)

Für die Ermittlung exakter Werte wurde dies von der Software berechnet. Um ein Ergebnis in der von uns gewünschten Einheit EBV-Genomkopien/ $\mu$ g PBMC-DNA zu erhalten, haben wir 10 $\mu$ l PBMC-DNA in der Konzentration von 50 $\mu$ l/ml (=500ng) eingesetzt und mussten das Ergebnis nur noch mit dem Faktor 2 multiplizieren.

Da das Plasma bei der Isolation der DNA um den Faktor 5 aufkonzentriert wurde, erhielten wir ein Ergebnis, welches unserer gewünschten Einheit, nämlich EBV-Genomkopien/100 $\mu$ l (bei Einsatz von 20 $\mu$ l) entsprach.

Die PCR wurde in einer 96-well Reaktionsplatte in dem Thermocycler ABI PRISM 7700 Sequence Detection System nach folgendem Protokoll durchgeführt.

2 min	50 °C	Für optimale Aktivität der AmpErase Uracil-N-glykosylase (UNG) zur Inaktivierung möglicher Kontaminationen
10 min	95 °C	Aktivierung der AmpliTaq Gold DNA Polymerase, sowie gleichzeitige Inaktivierung der UNG
40 Zyklen:		
15 sec	95 °C	Auftrennung des DNA-Doppelstranges
1min	60 °C	Hybridisierung der Primer, sowie der Sonde an die entsprechenden Oligonukleotide, sowie DNA-Synthese durch die Taq-Polymerase. Hierbei erfolgte die Abspaltung der Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase und folglich die Aufhebung der räumlichen Nähe zwischen dem Reporter und Quencher Farbstoff.
Abkühlung auf Raumtemperatur		

Tab. 4: Protokoll der PCR

#### **2.2.4 RNA Isolation**

Die DNA-Isolation aus PBMCs erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits von Qiagen auf eine vom Hersteller empfohlene Weise in mitgelieferten Reaktionsgefäßen. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte der Isolation kurz skizziert.

1. Auftauen der bei -80°C in RLT Puffer gelagerten Zellpellets.
2. Zugabe von 70% Ethanol und mischen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren. Dies sorgt für optimale Bindungsbedingungen an die Membran.
3. Platzieren einer RNeasy Mini-Spinsäule in ein 2ml Reaktionsgefäß (mitgeliefert) und auftragen der Probe auf die Säule. Zentrifugation für 15s bei  $\geq 10.000$ rpm. Anschließendes Verwerfen des Durchflusses.
4. Pipettieren von RW1 Puffer in die RNeasy Säule. Zentrifugation bei  $\geq 10.000$ rpm für 15sek zum Waschen. Verwerfen des Reaktionsgefäßes mitsamt Durchfluss
5. Platzieren der RNeasy Säule in ein neues 2ml Reaktionsgefäß (mitgeliefert) und Zugabe von RPE Puffer. Erneute Zentrifugation bei  $\geq 10.000$ rpm für 15 s zum Waschen und anschließendes Verwerfen des Durchflusses

6. Erneute Zugabe von RPE Puffer. Zentrifugation zum Trocknen der Silicagel-Membran für 2min bei  $\geq 10.000$ rpm  
Durch die Schritte 4-6 bindet die RNA an die Membran, während übrige Substanzen ausgewaschen werden.
7. Überführen der RNeasy Säule in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß
8. Zugabe von RNase-freiem Wasser auf die Membran. Zentrifugation für 1min bei  $\geq 10.000$ rpm.
9. Falls erwartete RNA-Ausbeute größer als 30 $\mu$ g war, wiederholen des Eluationsschrittes (Schritt 9) mit einem zweitem Volumen RNase-freien Wassers. Eluation in dasselbe Reaktionsgefäß.

### **2.2.5 Synthese von cDNA**

Basierend auf einer reversen Transkription kann aus RNA cDNA hergestellt werden. Für die Herstellung von cDNA haben wir folgendes Protokoll verwendet:

In einem sterilen 0,5ml Reaktionsgefäß wurden folgende Komponenten in der angegebenen Reihenfolge zugegeben und gemischt:

40-45 $\mu$ l	der zuvor isolierten RNA
2,5 $\mu$ l	Random Primers
2,5 $\mu$ l	dNTPs
<u>x<math>\mu</math>l</u>	<u>DEPC-Wasser</u>
50 $\mu$ l	Gesamtvolumen

Bei einer 15 minütigen Inkubation des Ansatzes bei 65 °C im PCR Thermocycler wurde die RNA denaturiert und durch anschließendes sofortiges Abkühlen für 1 Minute auf Eis wurden optimale Bedingungen für das Anlagern der Primer gegeben.

Für den Ansatz die Synthese des komplementären Stranges wurden folgende Komponenten in der angegebenen Reihenfolge zugegeben und gemischt:

20µl	5 x RT Puffer
10µl	DTT (0,1M)
2µl	RNasin
2µl	M-MLV Reverse Transkriptase
<u>16µl</u>	<u>DEPC-Wasser</u>
50µl	Gesamtvolumen

50µl dieses RT-Ansatzes wurden mit 50µl vorbehandelter RNA-Lösung versetzt. Die reverse Transkription durch die M-MLV RT erfolgte bei 37 °C für 60 Minuten im PCR Thermocycler. Durch anschließende Zugabe von 1µl RNase H und erneuter Inkubation bei 37 °C für diesmal 30 Minuten im PCR Thermocycler wurde die zur synthetisierten cDNA komplementäre RNA abgespalten.

Die so erhaltene einzelsträngige cDNA konnte bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C aufbewahrt werden.

### **2.2.6 Real-Time PCR für die qualitative Analyse der Expression von EBNA1, LP2, LMP1, LMP2a und ribosomaler RNA**

Um die Expression der latenten Gene EBNA1, LP2, LMP1 und LMP2a sowie das Vorhandensein ribosomaler RNA (rRNA) zu untersuchen, haben wir wiederum das Verfahren der Real-Time PCR angewendet.

Allerdings ergeben sich im Vergleich zum Bam HI-K Assay, auch aufgrund der Tatsache, dass wir bei diesem Versuch eine qualitative Analyse durchgeführt haben, einige Unterschiede. Für die qualitative Untersuchung der Expression der oben genannten Gene entfiel die Notwendigkeit des Mitführens einer Standardreihe zur quantitativen Berechnung der Kopienanzahl. Zudem haben wir von den Proben der Patienten eine cDNA Synthese vorgenommen, so dass wir einen mRNA Assay durchführen konnten.

Für die Assays zur qualitativen Bestimmung der Gene EBNA1, LP2, LMP1 und LMP2a haben wir Namalwa Zellen als externe positive Kontrolle in einer 1:100 Verdünnung in Doppelbestimmungen mitgeführt.

Im Falle des rRNA Assays haben wir Human Control RNA (mitgelieferte Kontrolle) als externe positive Kontrolle ebenfalls in Doppelbestimmungen mitgeführt.

Nachdem die Proben dem Bam HI-K Assay entsprechend vorbereitend aufgetaut wurden, haben wir zunächst die Synthese der cDNA vorgenommen. Anschließend wurden die Mengen an Mastermix, Primern, Sonden und Aqua ad injectabile berechnet, in ein steriles Reaktionsgefäß pipettiert, resuspendiert und die für die einzelnen Proben benötigten Mengen entnommen.

Neben den Proben, die wir in einer 1:1000 Verdünnung eingesetzt haben, und Positivkontrollen jeweils in Doppelbestimmungen, haben wir in jeweils 2 Reaktionsgefäße der Titerplatte Negativkontrollen mitgeführt, die anstelle von DNA destilliertes Wasser enthielten.

Aufgrund der Tatsache, dass es sich um eine quantitative Bestimmung handelt, sind lediglich die  $C_t$ -Werte nach Beendigung der 40 Amplifikationszyklen interessant, um entscheiden zu können, ob eine Expression der Gene stattfindet oder nicht, bzw. ob ribosomale RNA vorhanden ist oder nicht.

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde in dem Thermocycler ABI PRISM 7700 Sequence Detection System der Firma Applied Biosystems entsprechend dem Protokoll des Bam HI-K Ansatzes durchgeführt.

*Zu den jeweiligen Einfachansätzen der Bestimmungen siehe Anhang.*

Unter Anwendung dieser Methode haben wir insgesamt 37 Proben von 18 Patienten auf die Expression der verschiedenen Gene auf qualitativer Ebene hin untersucht. Einer dieser Patientin hatte zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits eine PTLD durchgemacht.

### **2.3 Statistische Analyse**

Für den statistischen Vergleich der Viruslasten der beiden Patientengruppen wurde der Mann-Whitney U Test verwendet. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert von  $< 0,05$  betrachtet. Korrelationsanalysen wurden unter Verwendung des Spearman-Rank-Tests durchgeführt. Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe von SPSS 14.0 für Windows (SPSS Inc. Richmond, CA; USA).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Vergleich der Messergebnisse in Plasma und PBMC beider Patientengruppen

Wir haben in den 153 Proben der 21 Patienten die Höhe der Epstein-Barr Viruslast in den PBMCs und im Plasma untersucht. Die erhaltenen Werte haben wir für die PBMCs und Plasma getrennt der Größe nach geordnet und durch Rangzahlen ersetzt, um mit Hilfe des Spearman-Rang-Tests den Korrelationskoeffizienten zu errechnen. Für den Vergleich der Viruslasten in den verschiedenen Materialien ergab sich ein Korrelationskoeffizient von 46,9% (Vgl. Abb. 3).

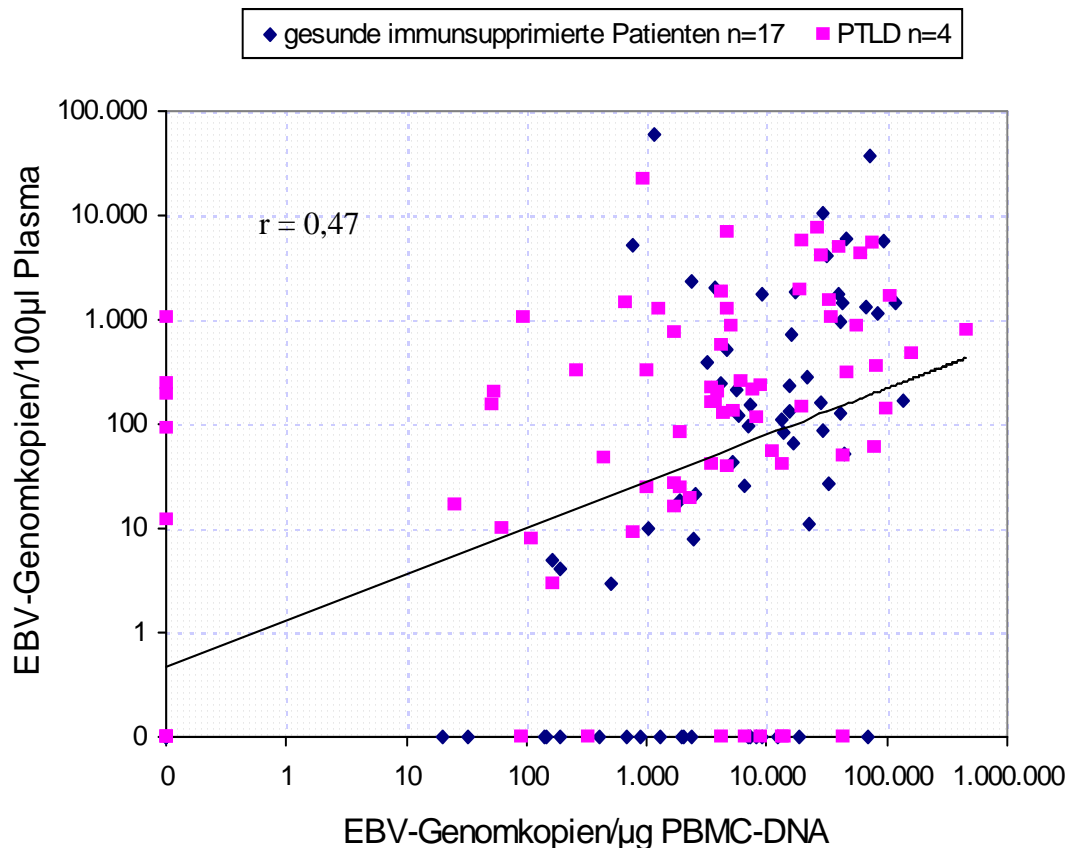


Abb. 3: Vergleich der Viruslast im Plasma und PBMCs



### 3.2 Vergleich der EBV-Last in PBMCs bei Patienten nach Herztransplantation mit und ohne PTLD

Beim Vergleich der Anzahl der EBV-Genomkopienzahl/ $\mu\text{g}$  PBMC-DNA der 17 immunsupprimierten Patienten ohne PTLD, mit der Anzahl der EBV-Genomkopien der Patienten, die eine PTLD entwickelten, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,639$ ). Die unauffälligen immunsupprimierten Patienten zeigten eine mediane Viruslast von 6.604 EBV-Genomkopien/ $\mu\text{g}$  PBMC-DNA (Spannweite: 0 - 137.970 EBV-Genomkopien/ $\mu\text{g}$  PBMC). Die mediane Viruslast der Patienten mit PTLD lag bei 4.174 EBV-Genomkopien/ $\mu\text{g}$  PBMC-DNA (Spannweite 0 - 446.209 EBV-Genomkopien/ $\mu\text{g}$  PBMC-DNA)

Alle PTLD-Patienten zeigten mindestens einmal eine Viruslast, die den Grenzwert von 5.000 EBV-Genomkopien/ $\mu\text{g}$  PBMC-DNA überschritt.

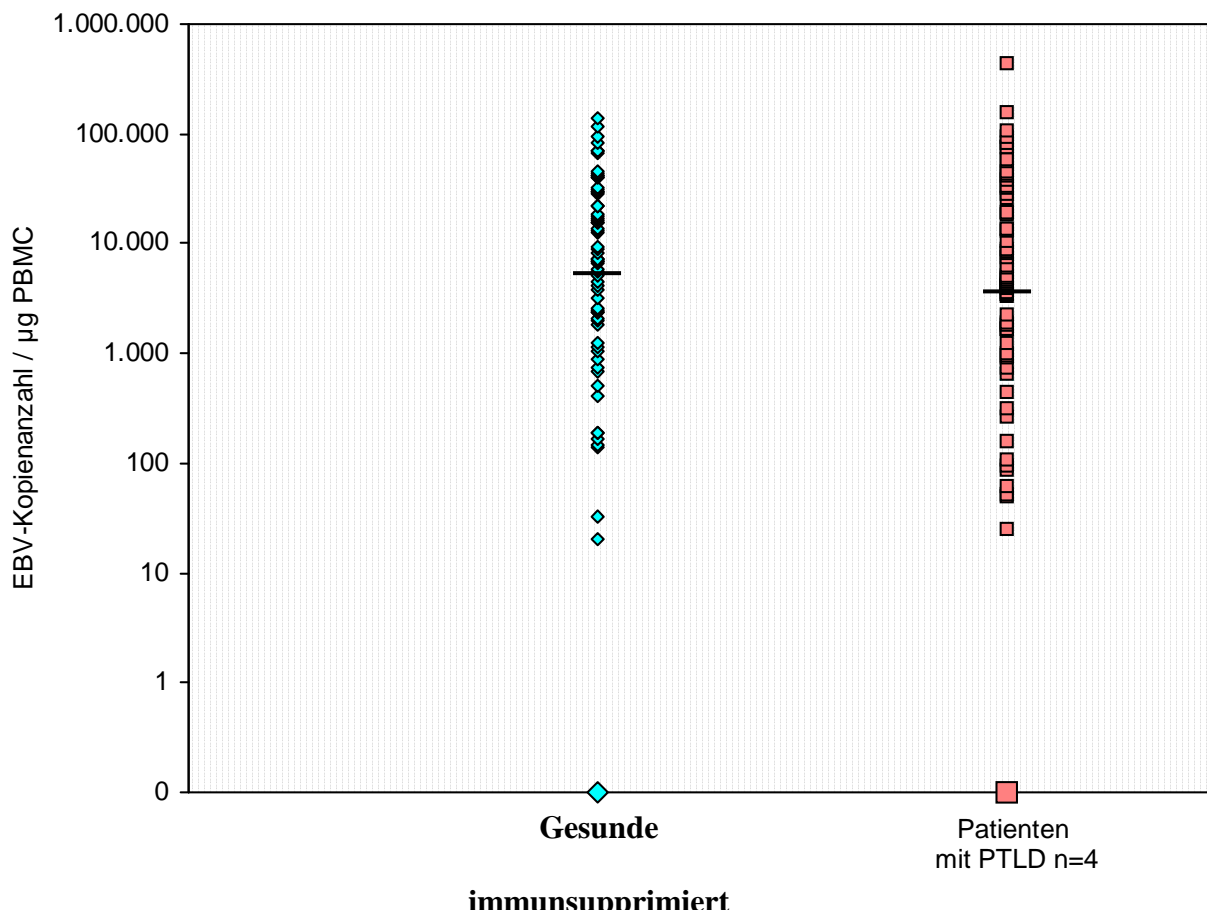


Abb. 4: Verteilung der EBV-Konzentrationen in PBMCs der gesunden immunsupprimierten Patienten und PTLD Patienten

### 3.3 Vergleich der EBV-Last im Plasma bei Patienten nach Herztransplantation mit und ohne PTLD

Die unauffälligen immunsupprimierten Patienten zeigten eine mediane Viruslast von 47 EBV-Genomkopien/100 $\mu$ l Plasma (Spannweite: 0 – 59.540 EBV-Genomkopien/100 $\mu$ l Plasma). Die mediane Viruslast der PTLD Patienten lag bei 156 EBV-Genomkopien/100 $\mu$ l Plasma (Spannweite 0 – 22.651 EBV-Genomkopien/100 $\mu$ l Plasma). Sowohl bei Kindern, die eine PTLD entwickelten, als auch bei der Vergleichsgruppe konnten Werte von über 1.000 EBV-Genomkopien/100 $\mu$ l Plasma gemessen werden. Die höchsten Werte zeigten klinisch unauffällige herztransplantierte Kinder mit einer maximalen Viruslast von 59.540 Genomkopien/100 $\mu$ l Plasma im Gegensatz zu einem Maximum von 22.651 Genomkopien/100 $\mu$ l Plasma bei PTLD Patienten.

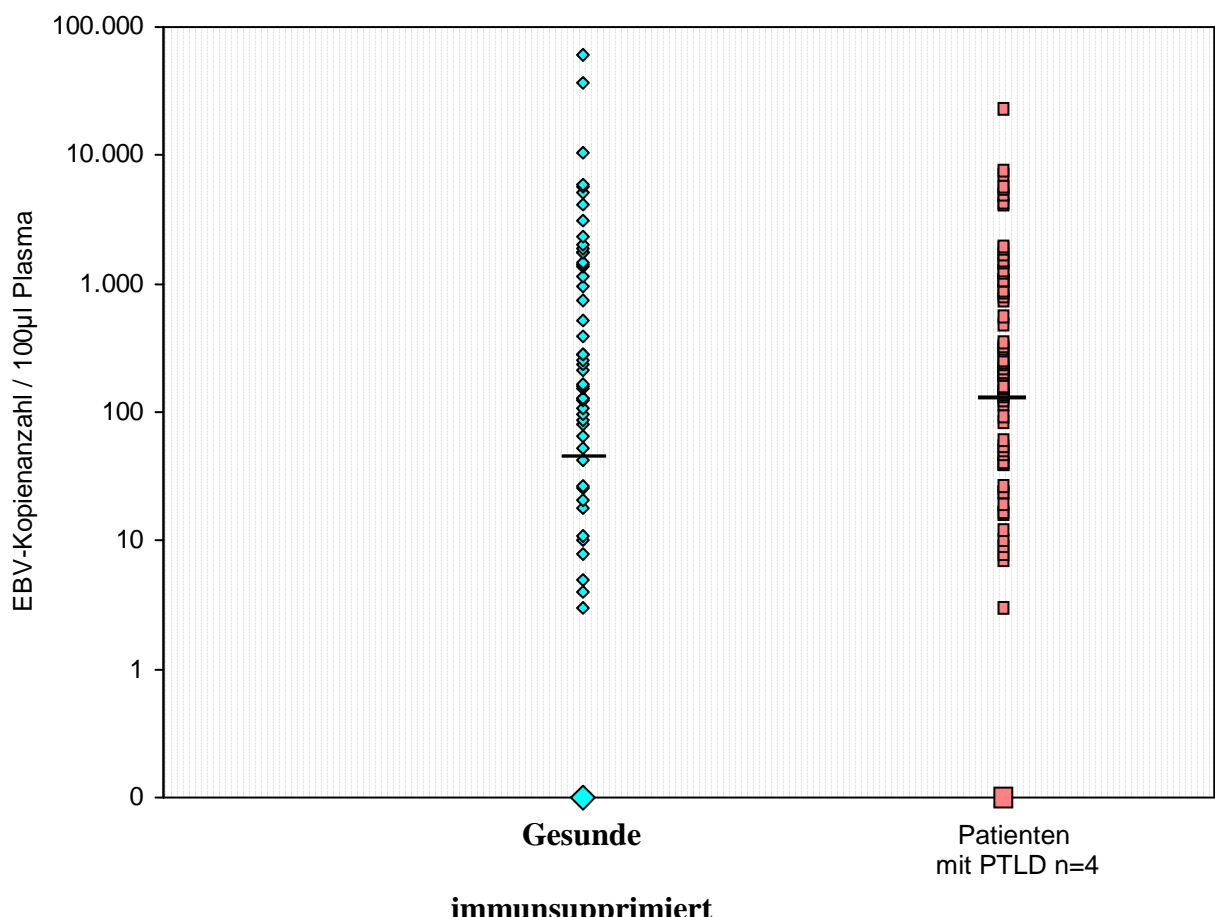


Abb. 5: Verteilung der EBV-Genomkonzentrationen im Plasma von gesunden immunsupprimierten Patienten und PTLD Patienten

### 3.4 EBV Last bei klinisch unauffälligen herztransplantierten Kindern

In der Gruppe der 17 herztransplantierten Kindern ohne Anzeichen einer PTLD lag die Viruslast in den PBMCs zwischen 0 und 137.970 EBV-Genomkopien/ $\mu$ g PBMC-DNA, im Median bei 6.604 EBV-Genomkopien/ $\mu$ g PBMC-DNA. Die Werte, die wir im Plasma gemessen haben, lagen zwischen 0 und 59.540 EBV-Genomkopien/100 $\mu$ l Plasma (Median 47 EBV-Genomkopien/100 $\mu$ l Plasma).

Sowohl die Viruslast im Plasma, als auch, jedoch weniger stark, die Viruslast in den PBMCs dieser Patienten waren erheblichen Schwankungen unterworfen. Die maximalen und minimalen EBV-Genomkopien mit den zugehörigen Mittelwerten der klinisch unauffälligen Patienten sind in den Abbildungen 6 und 7 für die Anzahl der EBV-Genomkopien/100 $\mu$ l Plasma, bzw. pro  $\mu$ g PBMC-DNA graphisch dargestellt. Nimmt man die niedrigsten und höchsten Werte eines Patienten ergibt sich daraus die Viruslast-Differenz. Der Median dieser Differenzen lag im Plasma bei 395 Genomkopien/100 $\mu$ l Plasma (minimale Differenz 0, max. 59.540 EBV-Genomkopien/100 $\mu$ l Plasma).

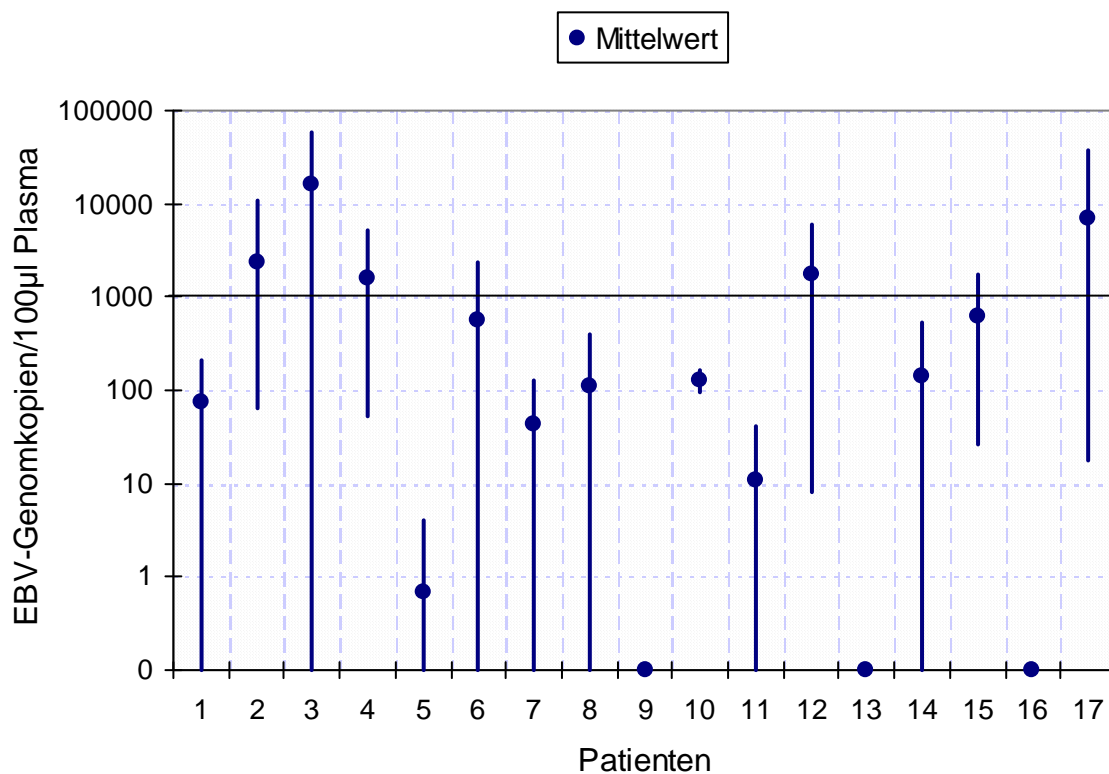


Abb. 6: Maximale und minimale Anzahl der EBV-Genomkopien/100 $\mu$ l Plasma mit zugehörigen Mittelwerten bei klinisch unauffälligen Patienten

\*: empirisch festgelegter Grenzwert von 1.000 EBV-Genomkopien/100 $\mu$ l Plasma, der Entwicklung einer PTLD anzeigt

Im Falle der PBMCs lag der Median der Viruslast-Differenzen bei 22.216 Genomkopien/ $\mu\text{g}$  PBMC-DNA (minimale Differenz 742, maximale Differenz.131.022 EBV-Genomkopien/ $\mu\text{g}$  PBMC-DNA). Bei allen Patienten konnte in mindestens einer Probe eine Viruslast festgestellt werden, die einen Wert von 5.000 EBV-Genomkopien/ $\mu\text{g}$  PBMC-DNA überschritt. Im Plasma konnte kein Wert festgestellt werden, der von allen Patienten überschritten wurde. Allerdings wurde der in der Literatur festgelegte Grenzwert von 1.000 EBV-Genomkopien/100 $\mu\text{l}$  Plasma (121) von 7 der von uns untersuchten gesunden immunsupprimierten Patienten überschritten.

Obwohl die gesunden immunsupprimierten Patienten zum Teil extrem hohe Viruslasten aufwiesen, kam es nicht zu einer Entwicklung einer PTLD.

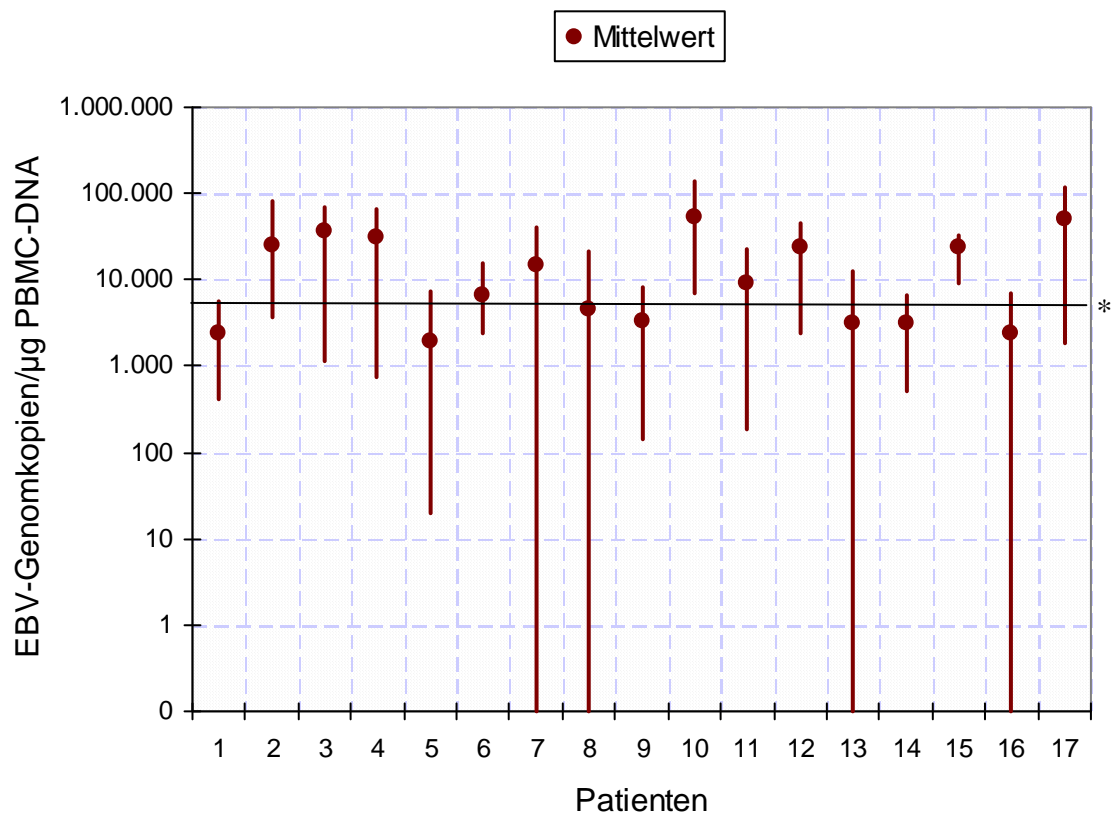


Abb. 7: Maximale und minimale Anzahl der EBV-Genomkopien/ $\mu\text{g}$  PBMC-DNA mit zugehörigen Mittelwerten bei klinisch unauffälligen Patienten

\*: empirisch festgelegter Grenzwert von 5.000 EBV-Genomkopien/ $\mu\text{g}$  PBMC-DNA zur Entwicklung einer PTLD

### 3.5 Verlauf der Viruslast in PBMCs bei PTLD-Patienten

Bei Diagnosestellung der PTLD zeigten alle Patienten (n=4) eine Viruslast, die den Grenzwert von 5.000 Genomkopien/ $\mu$ g PBMC weit überschritt.

#### Patient Nr. 1:

Wir haben 29 Proben in einem Zeitraum von 42 Monaten auf die Viruslast in den PBMCs hin untersucht. Die mediane Viruslast dieses Patienten betrug 3.493 Genomkopien/ $\mu$ g PBMC-DNA, die Spannweite von 0 - 76.326 Genomkopien/ $\mu$ g PBMC-DNA. 36 Monate nach Beginn unserer Untersuchungen entwickelte der Patient eine PTLD. Zu diesem Zeitpunkt betrug die Viruslast 8.769 Genomkopien/ $\mu$ g PBMC-DNA. Über einen Zeitraum von 15 Monaten vor Diagnose war die Viruslast konstant unter 1.000 Genomkopien/ $\mu$ g PBMC-DNA (Minimum 0, Maximum 652 Genomkopien/ $\mu$ g PBMC-DNA). Einen Monat vor Diagnose der PTLD wurde eine Viruslast von 8.053 Genomkopien/ $\mu$ g PBMC-DNA gemessen. Obwohl ca. 6 Monate nach Beginn unserer Untersuchungen die Viruslast des Patienten ein Maximum von 76.326 Genomkopien/ $\mu$ g PBMC-DNA erreichte, konnte zu diesem Zeitpunkt kein Hinweis für eine PTLD gefunden werden.

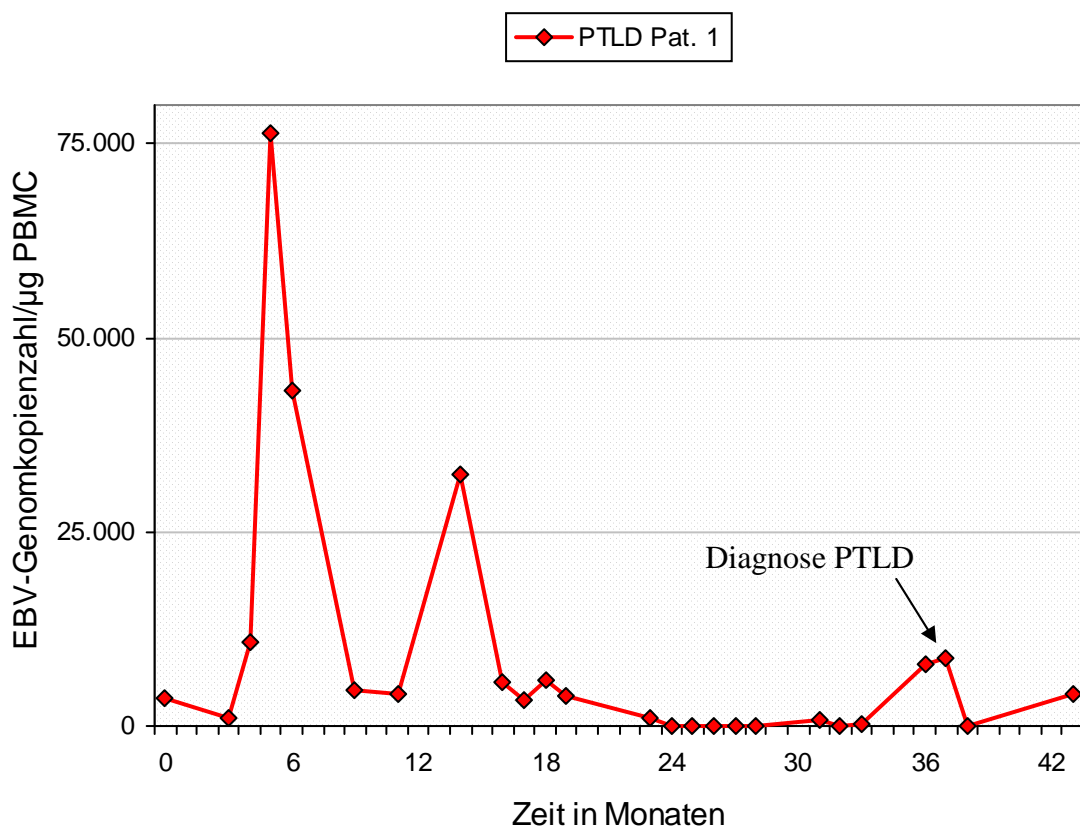


Abb. 8: Verlauf der Viruslast in den PBMCs bei Patient 1

Patient Nr. 2:

Bei dieser Patientin haben wir 22 Proben in einem Zeitraum von 46 Monaten auf die Viruslast in den PBMCs hin untersucht. Die mediane Viruslast der Patientin war 3.246 Genomkopien/ $\mu$ g PBMC-DNA mit einer Spannweite von 0 - 156.278 Genomkopien/ $\mu$ g PBMC-DNA. Ungefähr 18 Monate nach Beginn unserer Untersuchungen entwickelte die Patientin eine PTLD. Nachdem wir eine Viruslast von 95.773 EBV-Kopien/ $\mu$ g PBMC-DNA zwei Monate vor Diagnose der PTLD festgestellt hatten, fiel diese auf einen Wert von 10.844 Kopien/ $\mu$ g PBMC-DNA bei Diagnosestellung. Innerhalb von drei Monaten nach histologischer Sicherung der PTLD fiel die Viruslast auf 2.299 EBV-Kopien/ $\mu$ g PBMC-DNA. Im Gesamtverlauf von 26 Monaten ab Diagnose zeigte sich eine mediane Viruslast von 2.096 Genomkopien/ $\mu$ g PBMC-DNA (Spannweite: 0-19.633 Kopien/ $\mu$ g PBMC-DNA).

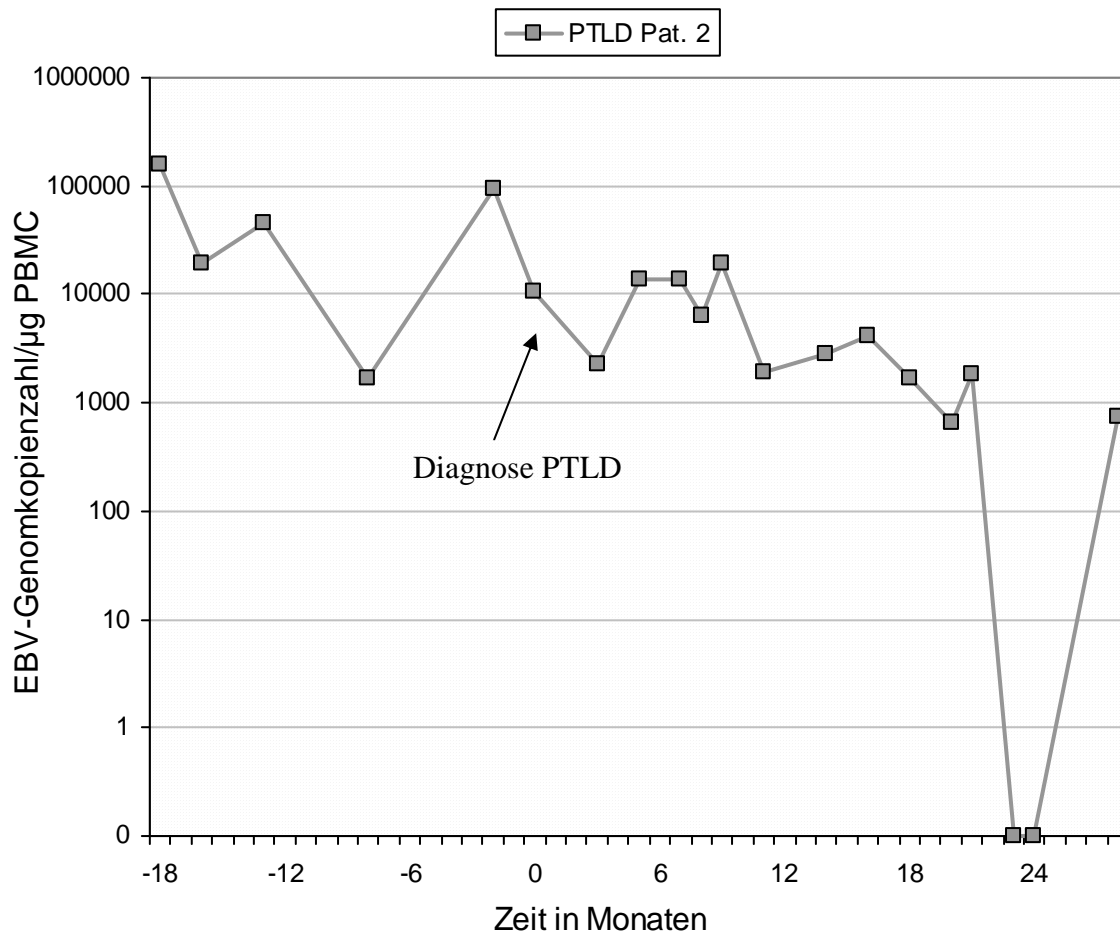


Abb. 9: Verlauf der Viruslast in den PBMCs bei Patient 2

Patient Nr.3:

Wir haben 11 Proben von diesem Patienten in einem Zeitraum von 20 Monaten untersucht, um die Viruslast in den PBMCs messen zu können. Die mediane Viruslast betrug hier 984 EBV-Genomkopien/ $\mu\text{g}$  PBMC-DNA mit einer Spannweite von 0 – 106.890 EBV-Genomkopien/ $\mu\text{g}$  PBMC-DNA. Die Zahl der Genomkopien bei der letzten Untersuchung, welche ungefähr 2 Monate vor Feststellen der PTLD stattfand, betrug 106.890 Kopien/ $\mu\text{g}$  PBMC-DNA. Diese sank innerhalb von 3 Monaten auf einen Wert von 2.393 EBV-Genomkopien/ $\mu\text{g}$  PBMC-DNA. Innerhalb weiterer 8 Wochen konnten zunächst keine EBV-Genomkopien in den PBMCs dieses Patienten nachgewiesen werden, die nächste Untersuchung erbrachte jedoch wieder einen Wert von 61 EBV-Genomkopien/ $\mu\text{g}$  PBMC-DNA.

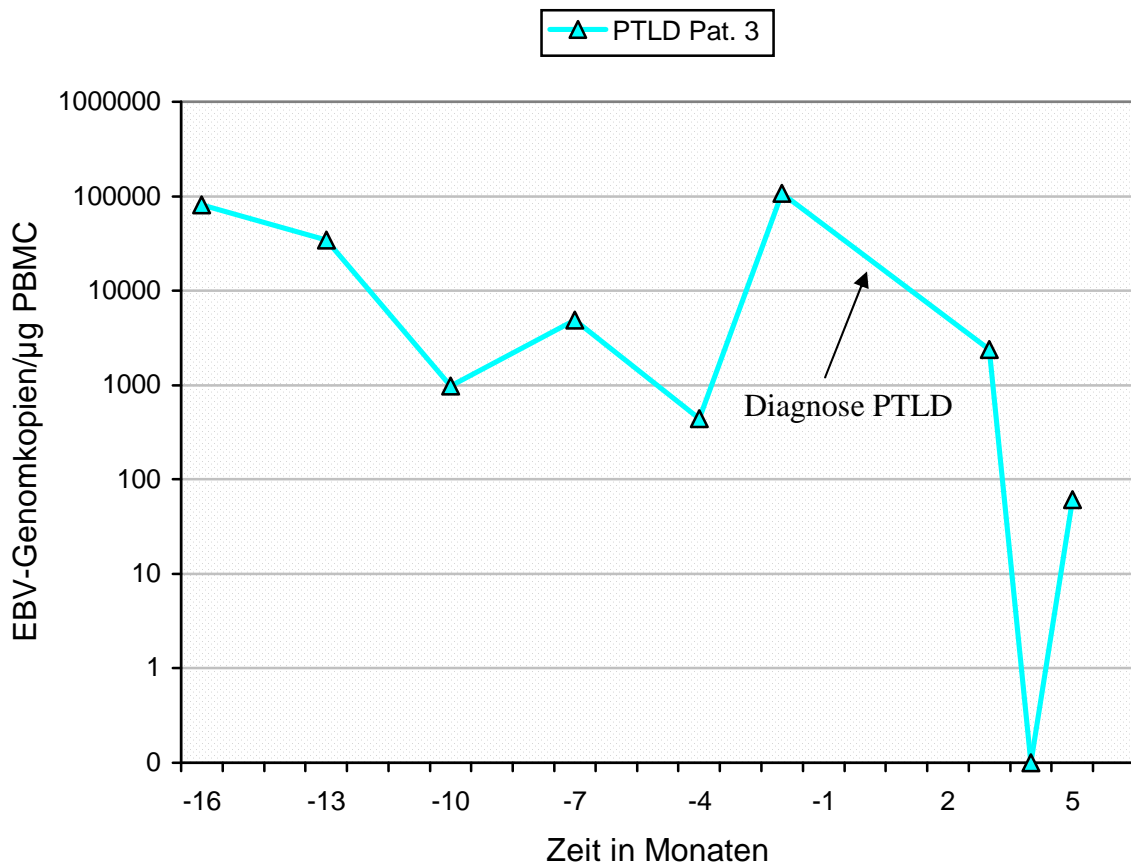


Abb. 10: Verlauf der Viruslast in den PBMCs bei Patient 3

Patient Nr. 4:

Dieser Patient lieferte 14 Proben in einem Zeitraum von 18 Monaten für unsere Untersuchungen. Die Median der Viruslast betrug hier 54.234 EBV-Genomkopien/ $\mu$ g PBMC-DNA (Spannweite von 162 – 446.209 EBV-Genomkopien/ $\mu$ g PBMC-DNA).

Die letzte Untersuchung vor Sicherung der Diagnose einer lymphoproliferativen Erkrankung post transplantationem erfolgte einen Monat vor dieser und erbrachte einen Wert von 55.944 EBV-Genomkopien/ $\mu$ g PBMC-DNA. Dieser stieg in einem Verlauf von 2 Monaten zunächst sogar auf 59.799 Kopien/ $\mu$ g PBMC-DNA an, um dann auf einen Wert von 26.039 Kopien/ $\mu$ g PBMC-DNA innerhalb eines weiteren Monats zu fallen.

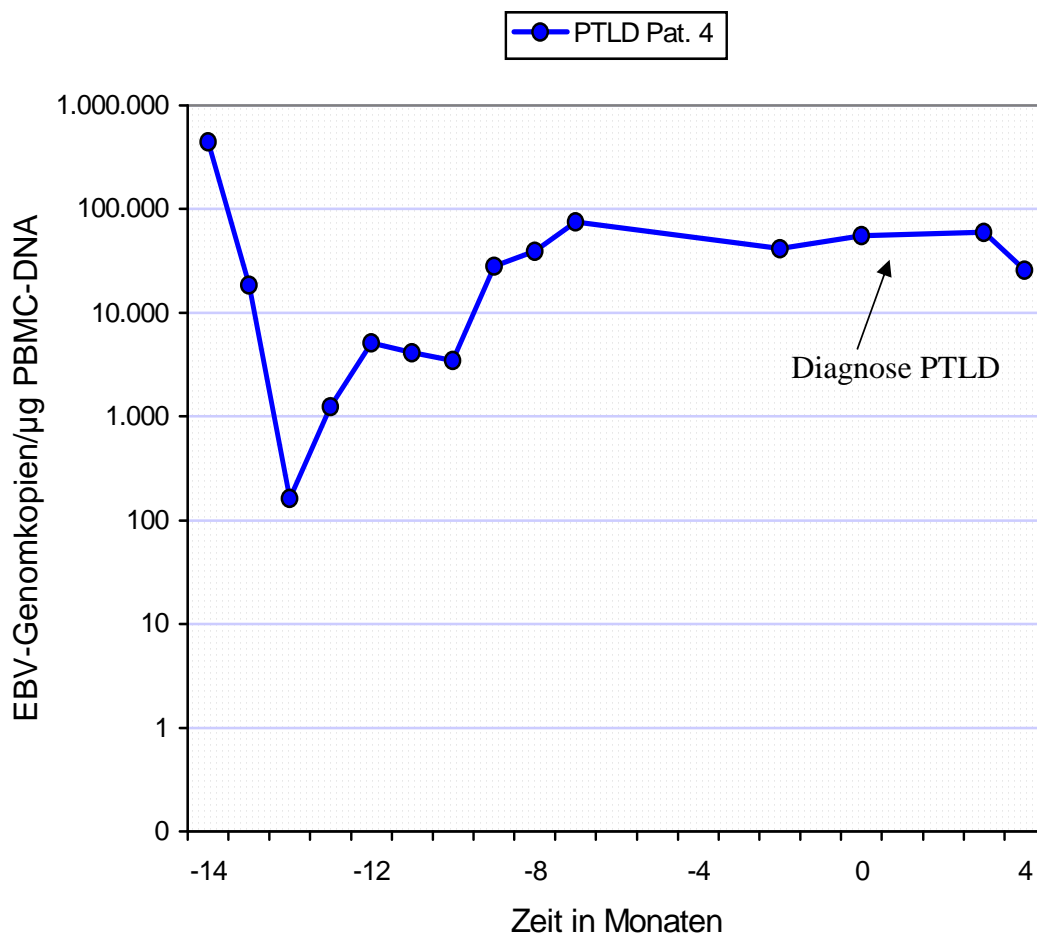


Abb. 11: Verlauf der Viruslast in den PBMCs bei Patient 4

Hinsichtlich des empirisch festgelegten Grenzwertes von 5.000 EBV-Genomkopien/ $\mu$ g PBMC DNA, der zur Risikoabschätzung der Entwicklung einer PTLD dient, konnten wir in den PBMC Proben aller PTLD Patienten EBV-Viruslasten messen, die diesen



Grenzwert bei Diagnosestellung überstiegen. Da dies jedoch auch bei jedem der 17 Patienten, die keine PTLD entwickelten, in mindestens einer Probe der Fall war, ergibt sich eine Sensitivität von 1,0, mit einem positiven Vorhersagewert von 0,19. Da alle Patienten mindesten einmal eine Viruslast über dem Grenzwert aufwiesen, liegt die Spezifität bei 0%, mit einem nicht zu erreichenden negativen Vorhersagewert, d.h. dass der Anteil der Falsch-positiven bei 1,0 liegt.

### 3.6 Verlauf der Viruslast im Plasma bei PTLD-Patienten

Die Ergebnisse der Viruslastmessungen im Plasma an PTLD erkrankter Patienten sind in Abb. 12 graphisch dargestellt.

Der Zeitpunkt 0 auf der x-Achse bezeichnet den Zeitpunkt der Diagnosestellung PTLD.

Nur bei Patient 3 ließ sich bei Diagnosestellung eine Viruslast messen, die 1.000 EBV-Genomkopien/100µl Plasma überstieg (1.046 EBV-Genomkopien/100µl Plasma). Patient 2 zeigte im Verlauf von 46 Monaten nur bei einer Untersuchung eine Viruslast, die die Höhe dieses kritischen Wertes überschritt, wobei dies bei einer Untersuchung ca. 15 Monate vor Entwicklung der PTLD war. Ebenfalls zeigt Patient Viruslasten, die 1.000 EBV-Genomkopien/100µl Plasma übersteigen. Insgesamt wurde diese Wert fünf Mal von Patient 1 überschritten, ohne dass Hinweise für die Entwicklung einer PTLD vorlagen. Bei Diagnosestellung sind keine EBV-Genomkopien im Plasma dieses Patienten nachweisbar gewesen.

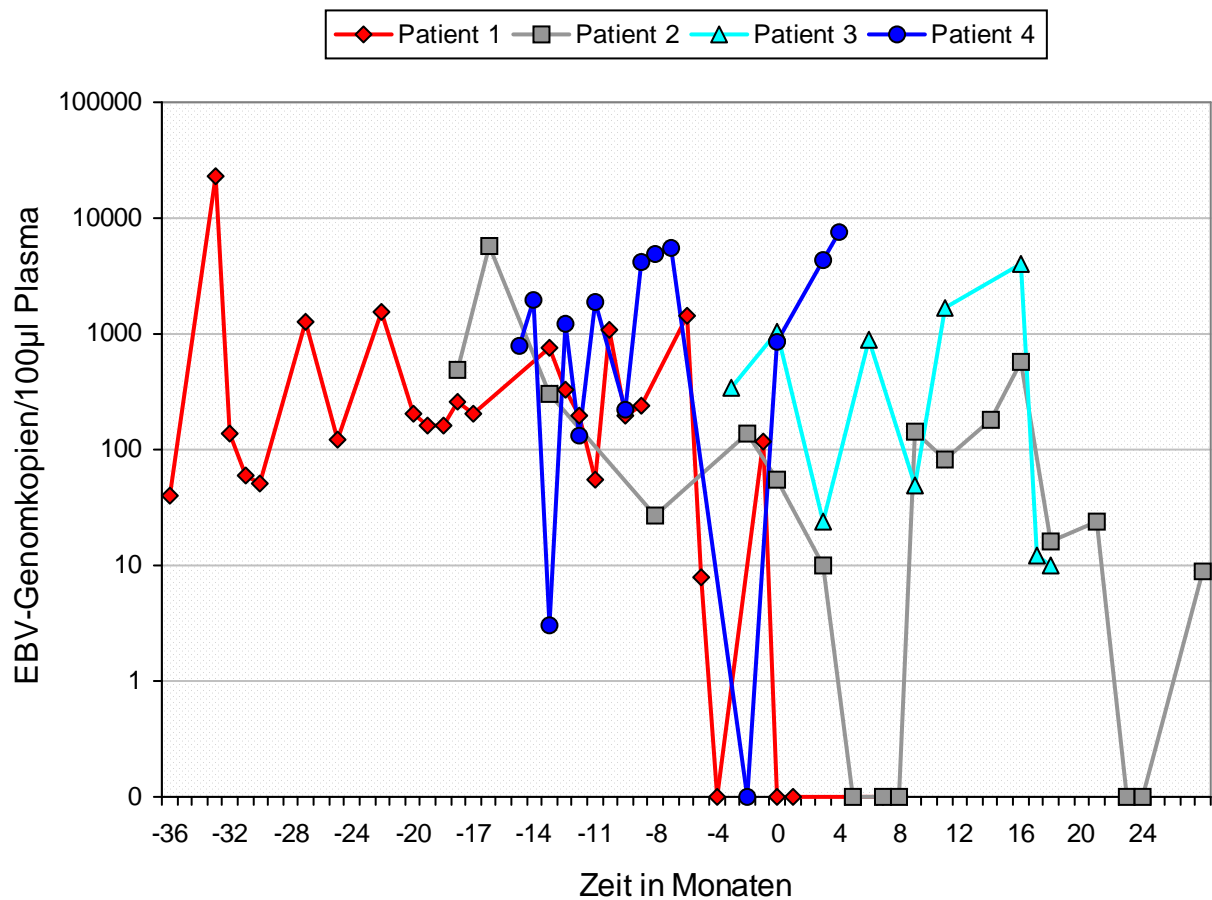


Abb. 12: Verlauf der Viruslast der Patienten mit PTLD im Plasma

Bei den Patient 2,3 und 4 stiegen die Viruslast-Werte im Verlaufe der Untersuchung auch nach histologischer Sicherung der PTLD, und damit einhergehender Behandlung mit Rituximab an und zeigten Schwankungen, die nicht mit der Viruslast in den PBMCs dieser Patienten korreliert werden konnte.

In den Plasmaproben konnten wir nur bei einem Patienten mit histologisch gesicherter PTLD bei Diagnosestellung eine Viruslast feststellen, die den empirisch festgelegten Grenzwert von 1.000 EBV-Genomkopien/100µl Plasma überstieg. Somit ergibt sich für die Plasmaproben eine Sensitivität von 0,25 und eine Spezifität von 0,41. Insgesamt zeigten 8 der 21 Patienten Viruslasten, die den Grenzwert in mindestens einer Probe überstiegen. Von diesen hatte aber tatsächlich nur einer eine histologisch gesicherte PTLD, was einen positiven Vorhersagewert von 1,25% ergibt. Der negative Vorhersagewert beträgt 0,77. 3 der 4 PTLD-Patienten wurden bei einem Grenzwert von 1.000 EBV-Genomkopien als falsch-negativ erkannt, da ihre Viruslasten diesen Grenzwert zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nicht überschritten hatten.

### **3.7 Ergebnisse der PCR latenter Gene**

Wir haben insgesamt 37 Proben von 18 verschiedenen Patienten auf die Expression der Gene EBNA1, LP2, LMP1 und LMP2a hin untersucht (vgl. Tab. 5). Nach dieser Untersuchung konnten wir das untersuchte Kollektiv in drei verschiedene Gruppen einteilen:

1. Keinerlei Genexpression: Bei 9 der 18 untersuchten Patienten (Probenanzahl n=15), zu der auch die Patientin mit bereits durchgemachter PTLD gehört, konnten wir in keiner Probe eine Expression der untersuchten Gene nachweisen.
2. fragliche Expression einiger Gene: Bei vier Patienten konnten eine fragliche Expression einiger Gene nachgewiesen werden (Probenzahl n=7). Zu diesen Genen gehören EBNA1, LMP1 und LMP2a. Die  $C_t$ -Werte dieser Patienten waren so hoch, dass dies auch ein falsch positives Ergebnis sein könnte.
3. vorhandene Genexpression: Bei 5 der 18 Patienten (Probenanzahl n=15) konnte in wenigstens einer Probe eine Expression für einige Gene nachgewiesen werden. Bei diesen Genen handelt es sich wiederum um EBNA1, LMP1 und LMP2a.

	EBNA 1	LP 2	LMP 1	LMP 2a	rRNA
<b>Patient No. 1</b>	-	-	-	(-)	+
	-	-	-	(+)	+
<b>Patient No. 2</b>	-	-	-	-	+
	-	-	-	-	+
	-	-	-	-	+
	-	-	-	-	+
<b>Patient No. 3</b>	-	-	-	-	+
<b>Patient No. 4</b>	-	-	+	(+)	+
	-	-	(-)	+	+
	-	-	+	+	+
<b>Patient No. 5</b>	-	-	-	(-)	+
	(+)	-	+	+	+
<b>Patient No. 6</b>	-	-	-	-	+
<b>Patient No. 7</b>	-	-	-	-	+
<b>Patient No. 8</b>	-	-	-	-	+
<b>Patient No. 9</b>	-	-	-	(+)	+
<b>Patient No. 10</b>	-	-	+	+	+
	-	-	-	+	+
<b>Patient No. 11</b>	-	-	-	-	+
<b>Patient No. 12</b>	-	-	-	-	+
	-	-	-	-	+
	-	-	-	-	+
<b>Patient No. 13</b>	-	-	(-)	(+)	+
	-	-	-	-	+
<b>Patient No. 14</b>	-	-	-	-	+
	-	-	-	-	+
<b>Patient No. 15</b>	-	-	-	-	+
<b>Patient No. 16</b>	-	-	-	-	+
	(+)	-	-	-	+
<b>Patient No. 17</b>	(+)	-	(+)	-	+
	(-)	-	(-)	-	+
	+	-	-	-	+
	(-)	-	-	(+)	+
	-	-	-	(-)	+
	(+)	-	+	+	+
<b>Patient No. 18</b>	-	-	-	+	+
	-	-	(+)	(+)	+

Tab. 5: Übersicht der Ergebnisse der qualitativen Genexpression  
 +: Genexpression vorhanden  
 (+): Genexpression fraglich  
 -: keine Genexpression vorhanden

Vergleicht man, wie oft das Ergebnis der Expression für die einzelnen Gene insgesamt positiv war, sieht man, dass das Gen für LMP2a am häufigsten exprimiert wurde, nämlich in 7 von 37 Proben. Darauf folgt das Gen für LMP1, mit einem Nachweis der Expression in 5 von 37 Fällen. In lediglich einer Probe konnte eine Expression des Genes für EBNA1 nachgewiesen werden. Das Ergebnis der PCR für das LP2 Gen war in allen Fällen negativ (vgl. Abb.13).

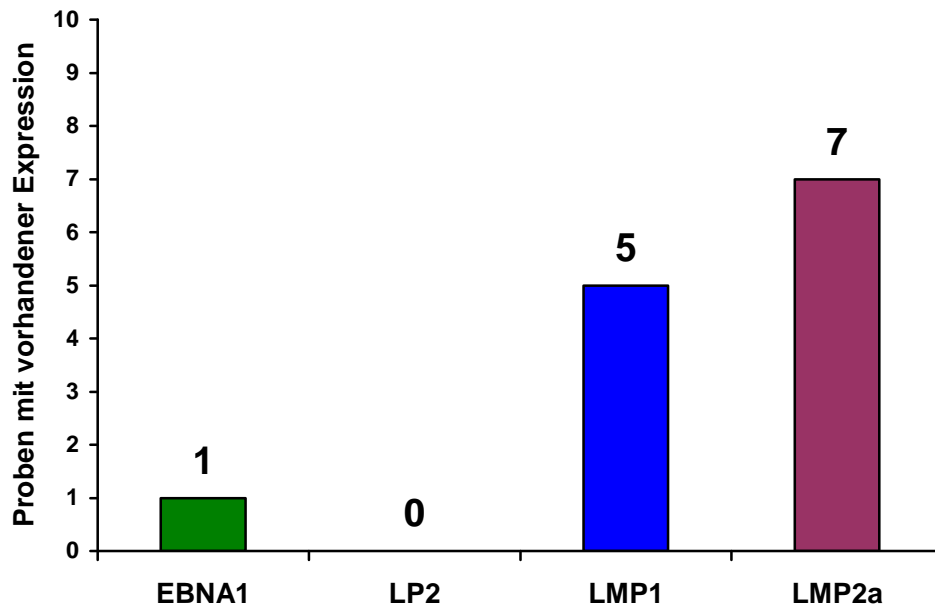


Abb. 13: Häufigkeit der Expression der von uns untersuchten Gene

Wir konnten keinen Zusammenhang zwischen der Viruslast und Genexpression oder Entwicklung einer PTLD und Genexpression nachweisen.

## **4 Diskussion**

Schon im Jahre 1981 wurde von Hanto und Mitarbeitern beschrieben, dass bei Patienten, die sich einer Knochenmarks- oder anderweitigen Organtransplantation unterziehen mussten, das Risiko für die schwerwiegende Komplikation einer lymphoproliferativen Erkrankung, für die ein Zusammenhang mit dem Epstein-Barr-Virus nachgewiesen werden konnte, besteht (44). Trotzdem gibt es bis heute keinen standardisierten diagnostischen Parameter für die frühzeitige Erkennung dieses Erkrankungsspektrums. Allerdings wäre die frühzeitige Diagnose insbesondere bei Patienten, die bereits einer Hochrisikogruppe zugeordnet werden konnten, wie z.B. Kinder, die meist aufgrund der Seronegativität dieser Gruppe zugeordnet werden, ein wichtiger Schritt, der das Überleben nach erfolgter Organtransplantation verbessern könnte.

Da über 50% der PTLD Fälle mit einer primären EBV-Infektion assoziiert sind, besteht ein besonders hohes Risiko für pädiatrische Organtransplantatempfänger (87, 109). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die EBV-Viruslast im peripheren Blut, sowie die Genexpression einiger latenter Gene des Epstein-Barr Virus bei pädiatrischer Patienten nach Herztransplantation, von denen einige eine PTLD entwickelten, untersucht und analysiert werden, um Parameter entwickeln zu können, die die frühzeitige Diagnose einer PTLD erlauben. Damit wäre die rechtzeitige Einleitung einer somit erfolgsversprechenden Therapie möglich.

### **4.1 Viruslastmessungen**

Die quantitative real-time PCR mittels TaqMan Technologie ist durch ihre Genauigkeit, Schnelligkeit trotz Doppelbestimmungen und vor allem wegen der fehlenden post-Amplifikationsarbeitsschritte, die das Risiko einer Probenkontamination erhöhen, ein geeignetes und vorteilhaftes Verfahren zur Bestimmung der Epstein-Barr-Viruslast in der klinischen Anwendung. Dies konnte bereits von mehreren Arbeitsgruppen bestätigt werden (3, 58, 82, 102).

In der vorliegenden Studie ist das Blut von 21 herztransplantierten, EBV-positiven Kindern hinsichtlich der Viruslast untersucht worden. 4 dieser 21 Kinder erkrankten an einer PTLD, die histologisch gesichert wurde.

Betrachtet man die Höhe der Viruslasten im Plasma und in den PBMCs in der Gruppe der klinisch unauffälligen Patienten einerseits und in der Gruppe der PTLD Patienten andererseits, lassen sich lediglich im Plasma als verwendetem Material signifikante Unterschiede in der Höhe der Viruslast zwischen den beiden Patientengruppen feststellen (3.2, 3.3). Die Gruppe der an PTLD erkrankten Kinder und die Gruppe der klinisch unauffälligen herztransplantierten Kinder weisen in der Höhe der Viruslast in den PBMC-Proben keine signifikanten Unterschiede auf, so dass sich diese beiden Gruppen in unserer Arbeit anhand der Höhe der Viruslast in den PBMCs nicht differenzieren lassen (3.4 bis 3.6).

Somit gibt die vorliegende Studie einen Anhalt dafür, dass Plasma als Untersuchungsmaterial für die EBV-Lastbestimmung durch quantitative real-time PCR mittels TaqMan Technologie besser geeignet zu sein scheint als mononukleäre Zellen des peripheren Blutes. Diese Hypothese wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen aufgestellt und bestätigt (73, 120, 128). Auch Kullberg-Lindh et al. konnten in Untersuchungen an Serum von Kindern nach Lebertransplantation einen signifikanten Unterschied der Epstein-Barr Viruslasten klinisch unauffälliger und an PTLD erkrankter Kinder feststellen (62). Neben der Tatsache, dass in dieser Studie die Viruslasten im Serum gemessen wurden, unterschied sich die in der PCR amplifizierte Sequenz von der, die in der vorliegenden Arbeit amplifiziert wurde, so dass sich diese Studie zumindest nicht zum direkten Vergleich heranziehen lässt.

Interessanterweise konnten in der vorliegenden Studie teilweise exzessive Elevationen der Epstein-Barr-Viruslast im Plasma und in den PBMCs verzeichnen. Die Viruslasten übersteigen die herangezogenen Grenzwerte von 1.000 EBV-Genomkopien/100µl Plasma, bzw. 5.000 EBV-Genomkopien/µg PBMC DNA, die bereits als spezifisch und sensitiv beschrieben wurden (121), teilweise stark. Dies war sowohl in der Gruppe der Patienten mit PTLD, als auch in der Gruppe der Patienten ohne PTLD nachzuweisen (vgl. Abb. 6 und 7, 3.5). Selbst wenn man den von Orentas (83) vorgeschlagenen Grenzwert von  $1 \cdot 10^4$  EBV-Genomkopien/µg PBMC DNA annimmt, liegen immer noch 16 unserer Patienten oberhalb dieses als normal angesehenen Bereichs.

In einer Arbeit, die methodisch mit dieser verglichen werden kann, war es bereits gelungen, die Patienten anhand der Höhe ihrer Epstein-Barr-Viruslast in vier verschiedene Gruppen einzuteilen, die entsprechend unterschiedlich hohe Risiken haben eine PTLD zu entwickeln - geringe Viruslast: unter 50 Genomkopien/µg PBMC DNA, mittlere Viruslast:



über 50, jedoch unter 500 Genomkopien/ $\mu$ g PBMC DNA, hohe Viruslast: über 500 Genomkopien/ $\mu$ g PBMC DNA und kritisch erhöhte Viruslast: über 5000 Genomkopien/ $\mu$ g PBMC DNA (122).

	Pädiatrische Patienten	Erwachsene Patienten
Niedrige EBV-Last: <50 EBV Kopien/ $\mu$ g PBMC DNA	0/26 (0%)	13/46 (2%)
Mittlere EBV-Last: <500 EBV-Kopien/ $\mu$ g PBMC DNA	1/26 (4%)	20/46 (44%)
Hohe EBV-Last: <5000 EBV-Kopien/ $\mu$ g PBMC DNA	1/26 (4%)	12/46 (26%)
Kritisch erhöhte EBV-Last: >5000 EBV-Kopien/ $\mu$ g PBMC DNA	5/26 (19%) mit PTLD 19/26 (73%) ohne PTLD	1/46 (2%) ohne PTLD

Tab. 6: EBV-Lastmessung bei herztransplantierten Kindern und Erwachsenen ( nach Wagner (122))

Versucht man die Patienten dieser Studie in die beschriebenen Gruppen einzuordnen, fallen alle Patienten, unabhängig von der Tatsache, ob eine PTLD vorlag oder nicht, in die Gruppe der kritisch erhöhten Viruslasten, da alle mindestens zu einem Zeitpunkt die Genomkopienzahl von 500/ $\mu$ g PBMC DNA überschreiten.

	Patienten ohne PTLD	Patienten mit PTLD
Niedrige EBV-Last: <50 EBV Kopien/ $\mu$ g PBMC DNA	0/17 (0%)	0/4 (0%)
Mittlere EBV-Last: <500 EBV-Kopien/ $\mu$ g PBMC DNA	0/17 (0%)	0/4 (0%)
Hohe EBV-Last: <5000 EBV-Kopien/ $\mu$ g PBMC DNA	0/17 (0%)	0/4 (0%)
Kritisch erhöhte EBV-Last: >5000 EBV-Kopien/ $\mu$ g PBMC DNA	17/17 (100%)	4/4 (100%)

Tab. 7: EBV-Lastmessung bei herztransplantierten Kindern mit und ohne PTLD

Dies zeigt, dass nicht nur die bereits beschriebenen Grenzwerte, sondern auch die Einteilung in verschiedene Risikogruppen anhand der Höhe der Viruslast für die Patienten dieser Arbeit aufgrund der generell hohen Viruslasten hinfällig sind.

Pädiatrische herztransplantierte Patienten zeigen in einem höheren Prozentsatz kritisch erhöhte EBV-Lasten, als erwachsene herztransplantierte Patienten (122) und pädiatrische nierentransplantierte Patienten (121). Zu den pädiatrischen herztransplantierten Patienten mit kritisch erhöhten EBV-Lasten zählen sowohl die PTLD-Patienten, als auch die Patienten ohne PTLD. Letztere haben wahrscheinlich ein höheres Risiko eine PTLD zu entwickeln. Dieses entscheidende Ergebnis, dass pädiatrische Patienten nach Herztransplantation eine exzessiv erhöhte Viruslast gegenüber anderen

Untersuchungskollektiven haben, sollte weiter untersucht werden. Ob hieraus ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer PTLD abzuleiten ist, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht geklärt. Es beweist jedoch, dass die Diagnose der PTLD weiterhin eine klinisch zu stellende ist, die einer histopathologischen Sicherung bedarf.

Neben der sehr hohen Viruslast konnten zudem starke Fluktuationen der Viruslast im Plasma und PBMCs beider Patientengruppen beobachtet werden (3.2, 3.3).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Elevation und Fluktuation der EBV-Last bei herztransplantierten Kindern zu erklären. Zum einen ist die Abhängigkeit der Viruslast von der Stärke der medikamentösen Immunsuppression dafür verantwortlich, dass es zu Schwankungen der Viruslast bei Modulation der immunsuppressiven Therapie kommt. Dieser dynamische Prozess kann sehr schnell durchlaufen werden - die Höhe der Viruslast kann sich innerhalb eines Tages um eine Zehnerpotenz verändern (83). Zum anderen benötigen Kinder nach Herztransplantation generell eine stärkere Immunsuppression, um eine Abstoßungsreaktion zu verhindern, als Kinder, die ein anderes Organ erhalten haben. Natürlich gibt es auch Faktoren, die die Viruslast beeinflussen, welche nicht in direktem Zusammenhang mit der Organtransplantation stehen. So können die Viruslasten auch durch eine chronische Beeinträchtigung des Immunsystems, unabhängig von der Transplantation oder durch Episoden anderer Krankheiten beeinflusst werden, die es dem Epstein-Barr Virus ermöglichen, seine Viruslast zu erhöhen.

Womit sich diese Schwankungen in der Höhe der Viruslast in dem vorliegenden Patientenkollektiv erklären lassen, kann nicht festgelegt werden, da außer den immunsuppressiven Medikamenten keine weiteren Angaben zur Therapie, wie z.B. Dosierung oder Anpassung, vorliegen.

Die hohe Sensitivität, jedoch niedrige Spezifität im Falle der PBMCs (vgl. 3.5) und die niedrige Sensitivität sowie die ebenfalls niedrige Spezifität im Falle des Plasmas (vgl. 3.6) zeigen, dass die hier angenommenen, empirisch festgelegten Grenzwerte von 5.000 EBV-Genomkopien/ $\mu$ g PBMC DNA und 1.000 EBV-Genomkopien/100 $\mu$ l Plasma zur Risikoabschätzung einer PTLD-Entwicklung, im Falle herztransplantierten Kinder wenig geeignet zu sein scheinen. Zwar konnten diese Grenzwerte bereits in zwei Arbeiten bestätigt werden, die hinsichtlich der Methodik und verwendetem Material zu der vorliegenden Untersuchung identisch waren (121, 122). Sie unterschieden sich jedoch in dem jeweils untersuchten Patientenkollektiv, das sich in dem einen Fall aus

nierentransplantierten pädiatrischen und nierentransplantierten erwachsenen Patienten (121) und im anderen Fall aus herztransplantierten erwachsenen Patienten (122) zusammensetzte. Die in anderen Arbeiten gemessenen EBV-Genomkonzentrationen und dort zum Teil festgesetzten Grenzwerte lassen sich aufgrund mangelnder Standardisierung (1.2.3) nicht mit dieser Untersuchung vergleichen. Auch die Hypothese, dass die Viruslasten im peripheren Blut bei Diagnose der PTLD im Vergleich zu einem nicht mit PTLD assoziierten Latenztyp 1.000 bis 10.000-fach erhöht sind, lässt sich hier aufgrund der teilweise exzessiven Höhe der EBV-Last, die auch bei Patienten ohne PTLD gemessen werden konnte (Vgl. Abb 6 und 7), nicht bestätigen (103).

Unabhängig von dem benannten Grenzwert lässt sich u.a. auch wegen der starken Fluktuationen in der Höhe der Viruslasten keine Korrelation zwischen der Entwicklung einer PTLD und Höhe der Epstein-Barr-Viruslast nachweisen, wie auch schon von Niesters (81) und Orentas (83) beschrieben. Somit lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass die alleinige Messung der Viruslast mittels quantitativer PCR zurzeit kein geeignetes Verfahren für das Monitoring herztransplantierte pädiatrischer Patienten im Hinblick auf die frühzeitige nicht-invasive Diagnose einer PTLD ist. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch Patienten mit einer geringen Viruslast eine PTLD entwickeln. Ob eine generelle Risikoabschätzung durch die alleinige Messung der Viruslast in Zukunft möglich sein wird, bleibt abzuwarten und sollte an größeren Patientenkollektiven untersucht werden. Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit scheint dies jedoch zurzeit sehr unwahrscheinlich. Bis auf weiteres ist also eine genaue klinische Beobachtung sowie histopathologische Beurteilung für eine Diagnosestellung unerlässlich.

Die hier erhobenen Ergebnisse legen nahe, dass die Höhe der EBV-Genomkonzentration, zumindest von folgenden Faktoren abhängt:

1. Art der Transplantation: Nierentransplantation (121) versus Herztransplantation versus allogene Stammzelltransplantation (52, 120).
2. Alter des Patienten: Erwachsene (122) versus pädiatrische Patienten

Der genaue Zusammenhang, bzw. eine Abhängigkeit der EBV-Genomkonzentrationen mit diesen beiden Faktoren, lässt sich anhand dieser Studie nicht abschließend nachweisen, da die Anzahl der in dieser Studie eingeschlossenen Patienten mit 21 Patienten zu gering ist.

Die EBV-Lastmessung ist zwar ein etabliertes Verfahren zur Diagnostik EBV-assoziiertes Erkrankungen, jedoch ist die Interpretation der Ergebnisse abhängig von der Erkrankung. Zum einen sind benigne von malignen Erkrankungen zu unterscheiden. Andererseits muss bei den malignen Erkrankungen zwischen Lymphomen (aus dem Spektrum der PTLD) und Karzinomen (NPC) differenziert werden. Zusätzlich müssen die oben erwähnten Faktoren, wie Art der Transplantation und Alter des Patienten, in die Interpretation der Ergebnisse der Viruslastmessungen miteinbezogen werden.

Im Hinblick auf das Abschätzen des Risikos einer PTLD Entwicklung wird das Festlegen eines neuen Grenzwertes durch die Tatsache erschwert, dass sich die Ergebnisse der meisten Studien nicht miteinander vergleichen lassen, da sich bis dato noch kein Standard für die Bestimmung der EBV-Last etabliert hat. Neben den schon oben beschriebenen Unterschieden im Material und dem PCR Verfahren (vgl. 1.2.3) kommen noch Unterschiede bezüglich des Patientenkollektivs im Hinblick auf Altersstruktur, und welches Organ transplantiert wurde sowie Unterschiede in den Einheiten, in denen die Höhe der EBV-Last angegeben wird, hinzu. Gerade hinsichtlich der Tatsache, dass die Höhe der Viruslast von verschiedenen Faktoren abhängig zu sein scheint (Art der Transplantation, Alter des Patienten), ist eine Standardisierung der EBV-Lastmessung notwendig.

Weitere Studien an größeren Patientenkollektiven sollten die EBV-Genomkonzentration in standardisierten Verfahren untersuchen, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen.

### **4.2 Genexpression:**

Die hier ermittelten Ergebnisse der qualitativen Untersuchung der Expression der Gene EBNA 1, EBNA-LP2, LMP1 und LMP2a zeigen, dass in den meisten Fällen die von uns untersuchten Gene nicht exprimiert wurden (3.7). Generell sind die durchgeführten Assays zum Nachweis des Genexpressionsmusters jedoch anwendbar und funktionsfähig, denn wie in Tab. 5 dargestellt, haben wir unterschiedliche Muster der Genexpression des Epstein-Barr Virus im peripheren Blut der Patienten nachgewiesen. Abschließende Aussagen bezüglich spezifischer Genexpressionsmuster, die in Zusammenhang mit einer PTLD stehen könnten, können anhand unserer Datenmenge nicht vorgenommen werden.

Die Weiterentwicklung, bzw. die Anwendung alternativer Methoden, besonders auch an größeren Mengen von Patientendaten zum Nachweis bestimmter Genexpressionsmuster ist wünschenswert. Von Interesse sind speziell die im Folgenden angeführten Methoden, die zum Teil schon in anderen Arbeiten erfolgreich angewendet werden konnten:

1. Eine RNA-Isolation ausschließlich aus B-Zellen könnte eine höhere RNA-Ausbeute bringen, da vor allem B-Lymphozyten infiziert werden und als Ort der Latenz und der lytischen Replikation des Epstein-Barr-Virus angesehen werden, und somit eine höhere Konzentration an EBV-DNA und RNA in diesen Zellen zu erwarten ist.
2. nested (geschachtelte) PCR: Das von Prang et al. (91) angewendete Verfahren der nested-PCR, welches zur Analyse der Genexpression des Epstein-Barr Virus herangezogen wurde, zeigt eine deutlich höhere Sensitivität bezüglich des Nachweises der Transkriptionsprodukte, als mit nicht geschachtelten PCR Verfahren zum gegenwärtigen Zeitpunkt erzielt werden kann. Es wäre interessant, welches Ergebnis eine nested-PCR hinsichtlich der Genexpression von EBNA1, LP2, LMP1 und LMP2a zeigen würde, und ob hierdurch eine Aussage über den Zusammenhang zwischen Genexpressionsmuster und PTLD zu treffen ist. Zusätzlich zu der gesteigerten Sensitivität einer nested-PCR gegenüber Standard-PCR Verfahren wird auch die Spezifität erhöht, welches einen weiteren Vorteil dieses Verfahrens aufzeigt.
3. Genchip-Analyse: Diese in den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts entwickelte Technologie kann Informationen über Unterschiede in der Genexpression zwischen verschiedenen Proben liefern, wobei parallele Analysen mehrerer tausend Einzelnachweise auf kleinstem Raum möglich sind. Dadurch ist dieses Verfahren besonders qualifiziert für den Nachweis und Aussage über Genexpressionen in geringen Mengen biologischen Materials, wie es bei uns der Fall war.

In einer Studie von Rowe et al. (103) konnten die Expression von EBNA1, LMP1, LMP2a, sowie EBNA2 in zeitlichem Zusammenhang der Diagnose PTLD nachgewiesen werden. Aufgrund der hier erhobenen Ergebnisse lässt sich jedoch kein Expressionsmuster nachweisen, dass die Diagnose einer lymphoproliferativen Erkrankung nach Transplantation einfacher machen würde.

Wie schon bei der Viruslastmessung diskutiert, gibt es auch in Bezug auf die Untersuchung der Genexpression bei EBV bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt kein Standardprotokoll für

die Bestimmung der Genexpression, so dass Vergleiche verschiedener Arbeiten schwierig sind.

Interessant wäre es zu wissen, wie sich die anderen Gene verhalten, die bei der Charakterisierung des Latenztypes eine Rolle spielen. Nach Optimierung des Verfahrens wäre es außerdem interessant zu wissen, ob es eine Korrelation zwischen Genexpression und Entwicklung einer PTLD oder Genexpression und Viruslast gibt.

Das Überleben nach einer Organtransplantation ist durch die Entwicklung der mit dem Epstein-Barr Virus assoziierten Lymphoproliferation post-transplantationem gefährdet. Um eine rechtzeitige und somit meist erfolgsversprechende Therapie einleiten zu können, ist die frühzeitige Diagnose dieses Spektrums an Erkrankungen notwendig. Erschwert wird dies allerdings durch die Tatsache, dass sich PTLDs klinisch sehr variabel präsentieren und zum Teil einer akuten Abstoßungsreaktion ähneln können. Es ist also von Vorteil, einen Parameter heranziehen zu können, mit dem man das Risiko für die Entstehung einer PTLD abschätzen kann und bzw. oder mit dem die frühzeitige möglichst nicht-invasive Diagnose möglich ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die alleinige und ausschließliche EBV-Viruslastmessung mit quantitativer PCR unter Verwendung der TaqMan Technologie zur Zeit wenig zur Risikoabschätzung einer PTLD Entwicklung bei herztransplantierten pädiatrischen Patienten geeignet ist. Außerdem wird in dieser Arbeit gezeigt, dass die Grenzwerte, die bislang für andere Patientengruppen identifiziert werden konnten, nicht auf das hier untersuchte Patientenkollektiv übertragbar sind, da diese Patientengruppe generell signifikant höhere Viruslasten aufweist. Somit bleibt das Spektrum der lymphoproliferativen Erkrankungen bei Kindern, die ein Herz als transplantiertes Organ erhalten haben, eine Diagnose, die nicht aufgrund laborchemischer Daten, sondern aufgrund der klinischen Präsentation gestellt und anschließend histologisch gesichert werden muss.

Durch folgende, möglichst standardisierte Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven, sollte geprüft werden, ob sich ein Grenzwert festlegen lässt, der in Patientengruppe, die pädiatrische Patienten nach Herztransplantation umfasst, die frühzeitige Diagnose einer PTLD durch das hier angewendete nicht-invasive Verfahren der

quantitativen PCR ermöglicht. Besonders für pädiatrische Patienten wäre ein prädiktiver Wert wünschenswert, da diese aufgrund ihrer meist vorhandenen Seronegativität vor Organtransplantation generell einem höheren Risiko ausgesetzt sind, an einer PTLD zu erkranken. Aus diesem Grunde wäre es ebenso wünschenswert, wenn sich ein Genexpressionsmuster als prädiktiver molekularer Marker identifizieren ließe, welches eine schnelle und präzise Risikoabschätzung in Bezug auf die Entwicklung einer PTLD zuließe.

Selbst für einen Verdachtsmoment reicht die Höhe der Viruslast nicht aus, da diese, wie hier nachgewiesen, sehr variabel ist und nicht mit der histologischen Diagnose einer PTLD korreliert. Eine Zuhilfenahme weiterer Parameter wie z.B. Viruslast oder Genexpressionsmuster, kann in Betracht gezogen werden, sollte aber aufgrund der bereits oben angeführten Gründe keinesfalls als alleinstehendes Diagnosekriterium angesehen werden. Vielmehr sind das wiederholte Testen und ein hohes Maß an Aufmerksamkeit gegenüber auffälligen Befunden, besonders in Hochrisikogruppen essentiell.

## **5 Zusammenfassung**

EBV-assoziierte Lymphoproliferationen nach Transplantation (PTLD) sind eine schwerwiegende, potenziell lebensbedrohliche Komplikation bei Transplantatempfängern. Die frühzeitige Diagnose und Therapie sind für eine erfolgreiche Behandlung dieses Krankheitsspektrums notwendig. Bis jetzt schien die EBV-Viruslastmessung organtransplantierter Patienten mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion in Echtzeit (RQ-PCR) geeignet, um das Risiko einer PTLD-Entwicklung abzuschätzen. Dabei spielen neben dem nicht-invasiven Charakter ein geringer technischer und zeitlicher Aufwand eine entscheidende Rolle.

Für unsere Untersuchungen standen uns 145 Proben von 21 herztransplantierten Kindern und Jugendlichen zur Verfügung, von denen 4 an einer PTLD erkrankten. Mittels RQ-PCR unter Verwendung der TaqMan-Technologie haben wir die EBV-Viruslast im Plasma und in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) untersucht, wobei wir die Bam-HI-K Region von EBV als zu amplifizierende Region wählten.

Zudem haben wir die Genexpression von EBNA-1, EBNA-LP, LMP-1a und LMP-2a von EBV mit Hilfe einer qualitativen real-time PCR untersucht, um ein Expressionsmuster identifizieren zu können, das Hinweise auf eine PTLD-Entwicklung geben könnte.

Die bislang geltenden Grenzwerte der Viruslast zur Risikoabschätzung einer PTLD-Entwicklung, scheinen für diese Gruppe herztransplantierter Kinder wenig geeignet. Diese Patienten zeigen exzessiv höhere Viruslasten, als herztransplantierte Erwachsene oder nierentransplantierte Kinder. Es gelang uns nicht, einen für unsere Patientengruppe geeigneteren Grenzwert der EBV-Last festzulegen. Die EBV-Lastinterpretation muss folglich an das Patientenkollektiv angepasst werden, abgeleitet aus unseren Ergebnissen mindestens hinsichtlich der klinischen Situation (immunkompetent/immunsupprimiert), des Alter des Patienten und der Art der Transplantation. Zudem konnten wir kein Genexpressionsmuster identifizieren, welches einen Hinweis auf Entwicklung einer PTLD gibt. Somit ist die Diagnose bei Verdacht auf eine PTLD weiterhin durch die klinische Beobachtung zu stellen und durch eine histopathologische Untersuchung zu sichern.



## 6 Anhang

### **Probenmaterial:**

5-10ml EDTA Blut pro Patient

Standardzelllinie Namalwa; American Type Culture Collection [ATCC] CRL-1432

### **Reagenzien:**

Ficoll Separationslösung für Standarddichtezentrifugation, Biochrom AG, Berlin

Spüllösung PBS Puffer, pH 7,2

QIAamp Blood Midi Kit, QIAGEN GmbH, Hilden

TaqMan Universal PCR Master Mix, PE Applied Biosystems, Foster City, USA

RNeasy Mini Kits, QIAGEN GmbH, Hilden

TaqMan Ribosomal RNA Control Reagents, PE Applied Biosystems, Foster City, USA

dNTPs (20mM), GE Healthcare Europe GmbH, München (formerly Amersham Pharmacia)

Random Hexamere, c = 0,1µg/µl, Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA

RT-Puffer (5x), Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA

DTT 0,1M Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA

RNasin, Promega GmbH, Mannheim

M-MLV Reverse Transkriptase, Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA

RNase H, Stratagene, Amsterdam, Niederlande

Primer und Sonden der Fa. TIBMOLBIOL, Berlin

### **Geräte:**

Spectrophotometer Ultrospec 2000, PharmaciaBiotech, Freiburg

ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Foster City, USA

### **Zusammensetzung der verschiedenen Einfachansätze:**

#### Quantitative Bestimmung der BAM HI-K Region:

- 25µl 2x Universal Mastermix (PE Applied Biosystems)
- 10,05µl / 0,05µl aqua ad injectabile im PBMC, bzw. Plasma-Ansatz
- 1,5µl EBNA1-VIC forward Primer (10µM, Konzentration (c) = 300nM)  
(Sequenz: 5'-CCG GTG TGT TCG TAT ATG GAC-3')

- 1,5µl EBNA1-VIC reverse Primer (10µM, c = 300nM)  
(Sequenz: 5'-GGG AGA CGA CTC AAT GGT GTA-3')
- 1,25µl EBNA1 Sonde (10µM, c = 200nM)  
(Sequenz: 5'-VIC-TGC CCT TGC TAT TCC ACA ATG TCG TCT T-TAMRA-3')
- 0,2µl CRP-FAM forward Primer (10µM, c = 100nM)  
(Sequenz: 5'-CCT GAC CAG CCT CTC TCA TGC-3')
- 0,2µl CRP-FAM reverse Primer (10µM, c = 100nM)  
(Sequenz: 5'-TGC AGT CTT AGA CCC CAC CC-3')
- 0,5µl CRP Sonde (10µM, c = 200nM)  
(Sequenz: 5'-FAM-TTT GGC CAG ACA GGT AAG GGC CAC C-TAMRA-3')

10µl Probe / Standard für PBMC-Ansatz, bzw. 20µl Probe / Aqua ad injeatible für Plasma und NTC (50µg/ml)

qualitative Bestimmung von EBNA 1-mRNA:

- 25µl 2x Universal Mastermix (PE Applied Biosystems)
- 0,125µl EBNA 1 forward Primer (20µM, Konzentration (c) = 50nM)  
(Sequenz: 5'-AGA CCT GGG AGC AGA TTC ACC -3')
- 0,75µl EBNA 1 reverse Primer (20µM, c = 300nM)  
(Sequenz: 5'-GTA CCT GGC CCC TCG TCA G-3')
- 0,5µl EBNA 1 FAM-Sonde (20µM, c = 200nM)  
(Sequenz: 5'-FAM-CCG CGG CCG TCT CCT TTA AGA TG-TAMRA-3')
- H<sub>2</sub>O (23,625µl – V<sub>template</sub>)

Volumen der Reaktionsgefäßes: 50µl

qualitativen Bestimmung von EBNA-LP 2-mRNA:

- 25µl 2x Universal Mastermix (PE Applied Biosystems)
- 0,75µl EBNA-LP2 forward Primer (20µM, Konzentration (c) = 300nM)  
(Sequenz: 5'-TGG ACC AAC CCG GCC C -3')
- 0,75µl EBNA-LP2 reverse Primer (20µM, c = 300nM)

(Sequenz: 5'-CCC TCC TAC GGA CTC GTC TGG G -3')

- 0,5µl EBNA-LP2 FAM-Sonde (20µM, c = 200nM)  
(Sequenz: 5'-FAM-CCG GTA GGC CAG AGG GTC CCC -  
TAMRA-3')
- H<sub>2</sub>O (23µl – V<sub>template</sub>)

Volumen der Reaktionsgefäßes: 50µl

qualitativen Bestimmung von LMP 1-mRNA:

- 25µl 2x Universal Mastermix (PE Applied Biosystems)
- 0,75µl LMP1 forward Primer (20µM, Konzentration (c) = 300nM)  
(Sequenz: 5'-GAG ACC TTC TCT GTC CAC TTG GA-3')
- 0,75µl LMP1 reverse Primer (20µM, c = 300nM)  
(Sequenz: 5'-TGC CTG TCC GTG CAA ATT C-3')
- 0,5µl LMP1 FAM-Sonde (20µM, c = 200nM)  
(Sequenz: 5'-FAM-TAC TCC TAC TGA TGA TCA CCC TCC  
TGC TCA- TAMRA-3')
- H<sub>2</sub>O (23µl – V<sub>template</sub>)

Volumen der Reaktionsgefäßes: 50µl

qualitativen Bestimmung von LMP 2a-mRNA:

- 25µl 2x Universal Mastermix (PE Applied Biosystems)
- 0,75µl LMP2a forward Primer (20µM, Konzentration (c) = 300nM)  
(Sequenz: 5'-GTT TGC ATT GCT GGC CG -3')
- 0,75µl LMP2a reverse Primer (20µM, c = 300nM)  
(Sequenz: 5'-ACG CTA GTA TCA GGA GCA CAA GC -3')
- 0,5µl LMP2a FAM-Sonde (20µM, c = 200nM)  
(Sequenz: 5'-FAM-CGG ACT ACA AGG CAT TTA CGT TCT  
GGT GA - TAMRA-3')
- H<sub>2</sub>O (23µl – V<sub>template</sub>)

Volumen der Reaktionsgefäßes: 50µl

qualitativen Bestimmung von ribosomaler RNA:

- 25µl 2x Universal Mastermix (PE Applied Biosystems)
- 0,25µl rRNA forward Primer (10µM, Konzentration (c) = 50nM) (PE Applied Biosystems)
- 0,25µl rRNA reverse Primer (10µM, c = 50nM) (PE Applied Biosystems)
- 0,25µl rRNA VIC-Sonde (40µM, c = 200nM) (PE Applied Biosystems)
- H<sub>2</sub>O (24,25µl – V<sub>template</sub>)

Volumen der Reaktionsgefäßes: 50µl

## 7 Literaturverzeichnis

1. Aris RM, Maia DM, Neuringer IP, Gott K, Kiley S, Gertis K und Handy J: Post-Transplantation Lymphoproliferative Disorder in the Epstein-Barr Virus Naïve Lung Transplant Recipients. *Am J Crit Respir Care Med* 1996; 154: 1712-1717
2. Baer R, Bankier AT, Biggin MD, Deininger PL, Farrell PJ, Gibson TJ, Hatfull G, Hudson GS, Satchwell GC, Seguin C, Tuffnell PS und Barrell BG: DNA Sequence and Expression of the B95-8 Epstein-Barr Virus Genome. *Nature* 1984; 310: 207-211
3. Baldanti F, Grossi P, Furione M, Simoncini L, Sarasini, Comoli P, Maccario R, Fiocchi R und Gerna G: High Levels of Epstein-Barr virus DNA in Blood of Solid-Organ Transplant Recipients and Their Value in Predicting Lymphoproliferative Disorders. *J Clin Microbiol* 2000; 38 (2): 613-618
4. Benkerrow M, Durandy A und Fischer A: Therapy for Transplant-Related Lymphoproliferative Diseases. *Haemat Oncol Clin North Am* 1993; 7: 467-475
5. Brink AATP, Dukers DF, van der Brule AJC, Oudejans JJ, Middeldorp JM, Meijer CJ und Jiwa M: Presence of Epstein-Barr Latency Type III at the Single Cell Level in Post-Transplantation Lymphoproliferative Disorders and AIDS Related Lymphomas. *J Clin Pathol* 1997; 50: 911-918
6. Buchwald D, Goldenberg DL, Sullivan JL und Komaroff AL: The "Chronic, Active Epstein-Barr Virus Infection" Syndrome and Primary Fibromyalgia. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 1132-1136
7. Caldwell RG, Brown RC und Longnecker R: Epstein-Barr Virus LMP2A Induces B-Cell Survival in Two Unique Classes of E $\mu$ LMP2A Transgenic Mice. *J Virol* 2000; 74: 1101-1113
8. Campe H, Jaeger G, Abou-Ajram C, Nitschko H, Griebel M, Montoya C, Klare B und Koszinowski U: Serial Detection of Epstein-Barr Virus DNA in Sera and Peripheral Blood Leucocyte Samples of Pediatric Renal Allograft Recipients with Persistent Mononucleosis-Like Symptoms Defines Patients at Risk to Develop Post-Transplant Lymphoproliferative Disease. *Pediatr Transplant* 2003; 7: 46-52
9. Cardullo RA, Agrawai S, Flores C, Zamecnik PC und Wolf DE: Detection of Nucleic Acid Hybridization by Nonradioactive Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 1988; 85: 8790-8794
10. Cesarman E, Chadburn A, Liu YF, Migliazza A, Dalla-Favera R und Knowles DM: BCL-6 Gene Mutations in Posttransplant Lymphoproliferative Disorders Predict Response to Therapy and Clinical Outcome. *Blood* 1998; 92: 2294-3202
11. Chadburn A, Suci-Foca N, Cesarman E, Reed E, Michler RE und Knowles DM: Post-transplantation Lymphoproliferative Disorders Arising in Solid Organ Transplant Recipients are Usually of Recipient Origin. *Am J Pathol* 1995; 147: 1862-1870

12. Chadburn A, Cesarman E und Knowles DM: Molecular Pathology of Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders. *Semin Diagn Pathol* 1997; 14: 15-26
13. Chen F, Zou JZ, di Renzo L, Winberg G, Hu LF, Klein E, Klein G und Ernberg I: A Subpopulation of Normal B Cells Latently Infected with Epstein-Barr Virus Resembles Burkitt Lymphoma Cells in Expressing EBNA-1 but not EBNA-2 or LMP-1. *J Virol* 1995; 69: 3752-3758
14. Clementi M: Quantitative Molecular Analysis of Virus Expression and Replication. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2030-2036
15. Cohen J: Cancer Etiology 23. Herpesviruses. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum R, Bast RC Jr, Gansler TS, Holland JF, Frei E: *Cancer Medicine*. 6. Aufl., BC Decker Inc, Hamilton, Canada 2003
16. Collins MH, Montone KT, Leahey RL, Hodinka RL, Salhany KE, Kramer DL, Deng C und Tomaszewski JE: Post-Transplant Lymphoproliferative Disease in Children. *Pediatr Transpl* 2001; 5: 250-257
17. Comoli P, Labirio M, Basso S, Baldanti F, Grossi P, Furione M, Viganò M, Fiocchi R, Rossi G, Ginevri F, Gridelli B, Moretta A, Montagna D, Locatelli F, Gerna G und Maccario R: Infusion of Autologous Epstein-Barr Virus (EBV)-Specific Cytotoxic T Cells for Prevention of EBV-Related Lymphoproliferative Disorder in Solid Organ Transplant Recipients with Evidence of Active Virus Replication. *Blood* 2002; 99: 2592-2598
18. Cordier M, Calender A, Billaud M, Zimmer U, Rousselet G, Pavlish O, Banchereau J, Tursz T, Bornmann G und Lenoir GM: 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* 1990; 64: 1002-1013
19. Craig FE, Gulley ML, und Banks PM: Posttransplantation Lymphoproliferative Disorders. *Am J Clin Pathol* 1993; 99: 265-276
20. Curtis RE, Travis LB, Rowlings PA, Sociè G, Kingma DW, Banks PM, Jaffe ES, Sale GE, Horowitz MM, Witherspoon RP, Shriner DA, Weisdorf DJ, Kolb HJ, Sullivan KM, Sobocinski KA, Gale RP, Hoover RN, Fraumeni JF Jr. und Deeg HJ: Risk of Lymphoproliferative Disorders after Bone Marrow Transplantation: a Multi-Institutional Study. *Blood* 1999; 94: 2208-2216
21. Davis CL: The Antiviral Prophylaxes of Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder. *Semin Immunopathol* 1998; 20: 437-453
22. Davis CL, Wool BL, Sabath DE, Joseph JS, Stehman-Breen C und Broudy VC: Interferon- $\alpha$  Treatment of Posttransplant Lymphoproliferative Disorder in Recipients of Solid Organ Transplants. *Transplantation* 1998; 66: 1770-1779
23. Davis JE und Moss DJ : Treatment Options for Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder and Other Epstein-Barr Virus-Associated malignancies. *Tissue Antigens* 2004; 63: 285-292

24. Dockrell DH, Strickler JG und Paya CV: Epstein-Barr Virus Induced T Cell Lymphoma in Solid Organ Transplant Recipients. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 180-182
25. Dotti G, Rambaldi A, Fiocchi R, Motta T, Torre G, Viero P, Gridelli B und Barbui T: Anti-CD20 Antibody (Rituximab) Administration for Patients with Late Occurring Lymphomas after Solid Organ Transplantation. *Haematologica* 2001; 86: 618-623
26. Dror Y, Greenberg M, Taylor G, Superina R, Hebert D, West L, Connolly B, Sena L, Allen U und Weitzman S: Lymphoproliferative Disorders after Organ Transplantation in Children. *Transplantation* 1999; 67: 990-998
27. Fahraeus R, Jansson A, Ricksten A, Sjoblom A und Rymo L: Epstein-Barr Virus Encoded Nuclear Antigen 2 Activates the Viral Latent Membrane Protein Promoter by Modulating the Activity of a Negative Regulatory Element. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7390-7394
28. Fingerroth JD, Weiss JJ, Tedder TF, Strominger JL, Biro PA und Fearon DT: Epstein-Barr Virus Receptor of Human B-Lymphocytes is the C3d Receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 4510-4514
29. Fleisher G, Henle W, Henle G, Lenette ET und Biggar RJ: Primary Infection with Epstein-Barr Virus in Infants in the United States: Clinical and Serologic Observations. *J Infect Dis* 1979; 139: 553-558
30. Frank D, Cesarman E, Liu YF, Michler RE and Knowles DM: Posttransplantation Lymphoproliferative Disorders Frequently Contain Type A and Not Type B Epstein-Barr Virus. *Blood* 1995; 1985: 1396-1403
31. Fries KL, Miller WE und Raab-Traub N: Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 Blocks p53-mediated Apoptosis Through the Induction of the A20 Gene. *J Virol* 1996; 70: 8653-8659
32. Fruehling S, Lee SK, Herrold R, Frech B, Laux G, Kremmer E, Grasser FA und Longnecker R: Identification of Latent Membrane Protein 2A (LMP-2A) Domains Essential for the LMP-2A Dominant-Negative Effect on B-Lymphocyte Surface Immunglobulin Signal Transduction. *J Virol* 1996; 70: 6216-6226
33. Fruehling S und Longnecker R: The Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif of Epstein-Barr Virus LMP2A is Essential for Blocking BCR-Mediated Signal Transduction. *Virology* 1997; 235: 241-251
34. Furlong D, Swift H und Roizman B: Arrangement of Herpesvirus Desoxyribonucleic Acid in the Core. *J Virol* 1972; 10: 1071-1074
35. Gärtner BC, Kortmann K, Schäfer M, Mueller-Lantzsch N, Sester U, Kaul H und Pees H: No Correlation in Epstein-Barr Virus Reactivation Between Serological Parameters and Viral Load. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2458
36. Geis WP, Iwatsuki S, Molnar Z, Giacchino JL, Kerman RH, Ing TS und Hano JE: Pseudolymphoma in Renal Allograft Recipients. *Arch Surg* 1978; 113: 461-466

37. Green M, Cacciarelli TV, Mazariegos GV, Sigurdsson L, Qu L, Rowe DT und Reyes J: Serial Measurement of Epstein-Barr Viral Load in Peripheral Blood in Pediatric Liver Transplant Recipients During Treatment for Posttransplant Lymphoproliferative Disease. *Transplantation* 1998; 66: 1641-1644
38. Green M, Michaels MG, Webber SA, Rowe DT und Reyes J: The Measurement of Epstein-Barr Associated Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders in Pediatric Solid Organ Transplant Recipients. *Pediatr Transplant* 1999; 3: 271-281
39. Gross TG, Steinbuch M, DeFor T, Sharpiro RS, McGlave P, Ramsay NK, Wagner JE und Filipovich AH: B-Cell Lymphoproliferative Disorders Following Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Risk Factors, Treatment and Outcome. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 251-258
40. Gross TG, Hinrichs SH, Davis JR, Mitchell D, Bishop MR und Wagner JE: Depletion of EBV-Infected Cells in Donor Marrow by Counterflow Elutriation. *Exp Hematol* 1998; 1926: 392-409
41. Gulley ML: Molecular Diagnosis of Epstein-Barr Virus-Related Diseases. *J Mol Diagn* 2001; 3: 1-10
42. Gustafsson A, Levitsky V, Zou JZ, Frisan T, Dalianis T, Ljungman P, Ringden O, Winiarski J, Ernberg I und Masucci MG: Epstein-Barr Virus (EBV) Load in Bone Marrow Transplant Recipients at Risk to Develop Post-Transplant Lymphoproliferative Disease: Prophylactic Infusion of EBV-Specific Cytotoxic T Cells. *Blood* 2000; 95: 807-814
43. Haddad E, Paczesny S, Leblond V, Seigneurin JM, Stern M, Achkar A, Bauwens M, Delwail V, Debray D, Duvoux C, Hubert P, de Ligny BH, Wijdenes J, Durandy A und Fischer A: Treatment of B-Lymphoproliferative Disorder with a Monoclonal Anti- Interleukin-6 Antibody in 12 Patients: A Multicenter Phase 1-2 Clinical Trial. *Blood* 2001; 97: 1590-1597
44. Hanto DW, Sakamoto K, Purtilo DT, Simmons RL und Najarian RS: The Epstein-Barr Virus in the Pathogenesis of Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders. Clinical, Pathologic, and Virologic Correlation. *Surgery* 1981; 90: 204-213
45. Haque T, Amlot PL, Helling N, Thomas JA, Sweny P, rolles K, Burroughs AK, Prentice HG und Crawford DH: Reconstitution of EBV-Specific T-Cell Immunity in Solid Organ Transplant Recipients. *J Immunol* 1998; 160: 6204-6209
46. Harjunpaa A, Wiklund T, Collan J, Janes R, Rosenberg J, Lee D, Grillo-Lopez A und Meri S: Complement Activation in Circulation and Central Nervous System after Rituximab (Anti-CD20) Treatment of B-Cell Lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2001; 42: 731-738
47. Harris NL, Ferris JA und Swerdlow SH: Posttransplant Lymphoproliferative Disorders: Summary of Society for Hematopathology Workshop. *Sem Diagn Pathol* 1996; 14: 8-14



48. Harris NL und Swerdlow SH: Posttransplant Lymphoproliferative Disorders (PTLD). Pathology and Genetics: Tumours of Haematopoetic and Lymphoid Tissues. WHO Classification of Tumours. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H und Verdiman JW: 264-269, IARC Press, Lyons, 2001
49. Henderson S, Rowe M, Gregory C, Croom-Carter D, Wang F, Longnecker R, Kieff E und Rickinson A: Induction of bcl-2 Expression by Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 Protects Infected B-Cells from Programmed Cell Death. Cell 1991; 65: 1107-1115
50. Henle G und Henle W: Seroepidemiology of the Virus. In: Epstein MA und Achong BG: The Epstein-Barr Virus. 297-320, Springer-Verlag, Berlin, 1979
51. Heslop HE, Ng CY, Li C, Smith CA, Loftin SK, Krance RA. Brenner MK und Rooney CM: Long-Term Restoration of Immunity against Epstein-Barr Virus Infection by Adoptive Transfer of Gene-Modified Virus-Specific T Lymphocytes. Nat Med 1996; 2: 551-555
52. Hoshino Y, Kimura H, Kuzushima K, Tsurumi T, Nemoto K, Kikuta A, Nishiyama Y, Kojima S, Matsuyama T und Moroshima T: Early Intervention in Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders based on Epstein-Barr Viral Load. Bone Marrow Transplant 2000 ; 26 : 199-201
53. His ED, Picken MM und Alkansas S: Post-Transplantation Lymphoproliferative Disorder of the NK Cell Type: a Case Report and Review of the Literature. Mod Pathol 1998; 11: 479-484
54. Jabs WJ, Hennig H, Kittel M, Pethig K, Smets F, Bucsky P, Kirchner H, Wagner HJ: Normalized Quantification by Real-Time PCR of Epstein-Barr Viral Load in Patients at Risk for Posttransplant Lymphoproliferative Disorders. J Clin Microbiol 2001; 39: 564-569
55. Kempkes B, Pich D, Zeidler R, Sugden B und Hammerschmidt W: Immortalization of Human B Lymphocytes by a Plasmid Containing 71 Kilobase Pairs of Epstein-Barr Virus DNA. J Virol 1995; 69: 231-328
56. Kieff E: Epstein-Barr Virus and its Replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley P, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B und Straus SE: Fields Virology, 3. Aufl., 2343-2396, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996
57. Kieff E und Rickinson AB: Epstein-Barr Virus and its Replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley P, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B und Straus SE: Field Virology, 4. Aufl 2511-2573, Lippincott-Raven, Philadelphia, 2001
58. Kimura H, Morita M, Yabuta Y, Kuzushima K, Kato K, Kojima S, Matsuyama T und Morishima T: Quantitative Analysis of Epstein-Barr Virus Load by Using a Real Time PCR Assay. J Clin Microbiol 1999; 37: 132-136
59. Knecht H, Berger C, Al-Homsi AS, McQuain C, Brousset P: Epstein-Barr Virus Oncogenesis. Critical Reviews in Hematology and Oncology 1997; 26: 117-135

60. Knowles DM, Cesarman E, Chadburn A, Frizzera G, Chen J, Rose EA and Michler RE: Correlative Morphologic and Molecular Genetic Analysis Demonstrates Three Distinct Categories of Post Transplantation Lymphoproliferative Disorders. *Blood* 1995; 85: 552-565
61. Kuehnle I, Huls MH, Liu Z, Semmelmann M, Krance RA, Brenner MK, Rooney CM und Heslop HE: CD20 Monoclonal Antibody (Rituximab) for Therapy of EpsteinBarr Virus Lymphoma after Hemopoietic Stem-Cell Transplantation. *Blood* 2000; 95:1502-1505
62. Kullberg-Lindh C, Ascher H, Saalman R, Olausson M, Lindh M: Epstein-Barr viremia levels after pediatric liver transplantation as measured by real-time polymerase chain reaction. *Pediatr Transplantation* 2006; 10: 83-89
63. Levitskaya J, Coram M, Levitsky V, Imreh S, Steigerwald-Mullen PM, Klein G, Kurilla MG und Masucci MG: Inhibition of Antigen Processing by the Internal Repeat Region of the Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen-1. *Nature* 1995; 375: 685-688
64. Lewin N, Aman P, Akerlund B, Gustavsson E, Carenfelt C, Lejeborn L, Klein G und Klein E: Epstein-Barr Virus-Carrying B Cells in the Blood During Acute Infectious Mononucleosis Give Rise to Lymphoblastoid Lines in Vitro by Release of Transforming Virus and by Proliferation. *Immun Lett* 1990; 26: 59-65
65. Liebowitz D: Epstein-Barr Virus and a Cellular Signalling Pathway in Lymphomas from Immunosuppressed Patients. *New Engl J Med* 1998; 338: 1413-1421
66. Limaye AP, Huang ML, Atienza EE, Ferrenberg JM und Corey L: Detection of Epstein-Barr Virus DNA in Sera from Transplant Recipients with Lymphoproliferative Disorders. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1113-1116
67. Lin JC, Smith MC und Pagano JS: Prolonged Inhibitory Effect of 9-(1,3-dihydroxy 2-propoxymethyl) Guanine against Replication of Epstein-Barr Virus. *J Virol* 1984; 50: 50-55
68. Lucas KG, Burton RL, Zimmerman SL, Wang J, Cornetta KG, Robertson KA, Lee KH und Emanuel DJ: Semiquantitative Epstein-Barr Virus (EBV) Polymerase Chain Reaction for the Determination of Patients at Risk for EBV-Induced Lymphoproliferative Disease after Stem Cell Transplantation. *Blood* 1998; 91: 3654-3661
69. Manez R, Breinig MC, Linden P, Wilson J, Torre-Cisneros J, Kusne S, Dummer S und Ho M: Posttransplant Lymphoproliferative Disease in Primary Epstein-Barr Virus Infection after Liver Transplantation: The Role of Cytomegalovirus Disease. *J Infect Dis* 1997; 176: 1462-1467
70. Martinez OM, Villanueva JC, Lawrence-Miyasaki L, Quinn MB, Cox K und Krams SM: Viral and Immunologic Aspects of Epstein-Barr Virus Infection in Pediatric Liver Transplant Recipients. *Transplantation* 1995 ; 1995 : 519-524

71. Masucci MC und Ernberg I: Epstein-Barr Virus: Adaption to a Life within the Immune System. *Trend Microbiol* 1994; 2: 125-130
72. Matsukura T, Yokoi A, Egawa H, Kudo T, Kawashima M, Hirata Y, Tanaka H, Kagajo K, Wada H und Tanaka K: Significance of Serial Real-Time PCR Monitoring of EBV Genome Load in Living Donor Transplantation. *Clin Transplant* 2002; 16:107-112
73. Maurmann S, Fricke L, Wagner HJ, Schlenke P, Hennig G, Steinhoff J und Jabs W: Molecular Parameters for Precise Diagnosis of Asymptomatic Epstein-Barr Virus Reactivation in Healthy Carriers. *J Clin Microbiol* 2003; 12: 5419-5428
74. Milpied N, Vasseur B, Parquet N, Garnier JL, Antoine C, Quartier P, Carret AS, Bouscary D, Faye A, Boubiqot B, Requerre Y, Stoppa AM, Bourquard P, Huralt dLigny B, Dubief F, Mathieu-Boue A und Leblond V: Humanized Anti CD20 Monoclonal Antibody (Rituximab) in Post-Transplant B-Lymphoproliferative Disorder : A Retrospective Analysis on 32 Patients. *Ann Oncol* 2000 ; 11 : 113-116
75. Miyashita EM, Yang B, Babcock GJ und Thorley-Lawson DA : Identification of the site of Epstein-Barr Persistence in Vivo as a Resting B cell. *J Virol* 1998; 71: 4882-4891
76. Nalesnik MA, Jaffe R, Starzl TE, Demetris AJ, Porter K, Burnham JA, Mokowka L, Ho M und Locker J: The Pathology of Post Transplant Lymphoproliferative Disorders Occuring in the Setting of Cyclosporin A-Prednisone Immunosuppression. *Am J Pathol* 1988; 133: 173-192
77. Nalesnik MA, Makowka L und Starzl TE: The Diagnosis and Treatment of Posttransplant Lymphoproliferative Disorders. *Curr Prob Surg* 1988; 25: 367-372
78. Nalesnik MA: Clinical and Pathologic Features of Posttransplant Lymphoproliferative Disorders (PTLD). *Springer Semin Immunopathol* 1998; 29: 325-342
79. Nalesnik MA: The Diverse Pathology of Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders: The importance of a Standardized Approach. *Transpl Infect Dis* 2001; 3: 88-96
80. Nemerow GR, Wolfert R, McNaughton ME und Cooper NR: Identification and Characterization of the Epstein-Barr Virus Receptor on Human B Lymphocytes and its Relationship to the C3d Complement Receptor (CR2). *J Virol* 1985; 55: 347-351
81. Niesters HG, van Esser J, Fries E, Wolthers KC, Cornelissen J und Osterhaus AD: Development of a Real-Time Quantitative Assay for Detection of Epstein-Barr Virus. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 712-715
82. Orentas RJ: Determination of Epstein-Barr Virus (EBV) Load by RT-PCR and Cellular Dilution. *Mol Cell Probes* 1998; 12: 427-430

83. Orentas RJ, Schauer DW Jr, Ellis FW, Walczak J, Casper JT und Margolis DA: Monitoring and modulation of Epstein-Barr virus loads in pediatric transplant patients. *Pediatr Transplant* 2003; 7: 305-314
84. Otsuki T, Yano T, Clark HM, Bastard C, Kerckaert JP, Jaffe ES, Raffeld M: Analysis of LAZ3 (BCL-6) Status in B-Cell Non-Hodgkin's Lymphomas: Results of Rearrangement and Gene Expression Studies and a Mutational Analysis of Coding Region Sequences. *Blood* 1995; 85: 2877-2884
85. Oudejans JJ, Jiwa NM, van den Brule AJC, Grasser FA, Horstman A, Vos W, Kluin PM, van der Valk P, Walboomers JM und Meijer CJ: Detection of Heterogenous Epstein-Barr Virus Gene Expression Patterns Within Individual Posttransplantation Lymphoproliferative Disorders. *Am J Pathol* 1995; 147: 923-933
86. Paya CV, Fung LL, Nalesnik MA, Kieff E, Green M, Gores G, Habermann TM, Wiesner PH, Swinnen JL, Woodle ES und Bromberg JS: Epstein-Barr Virus Induced Posttransplant Lymphoproliferative Disorders. *Transplantation* 1999; 68: 1517-1525
87. Penn I: De Novo Tumours in Pediatric Organ Transplant Recipients. *Transpl Proc* 1991; 26: 1-2
88. Penn I: Immunosuppression – A Contributory Factor in Lymphoma Formation. *Clin Transplant* 1992; 6: 214
89. Pope JH, Achong BG, Epstein MA and Biddulph J: Burkitt Lymphoma in New Guinea: Establishment of a Line of Lymphoblasts in Vitro and Description of their Fine Structure. *J Natl Cancer Inst* 1967; 39: 933-945
90. Prang N, Reischl U, Arndt R, Meier T, Mayer J, Schwarzmann F und Wolf H: Identification of Epstein-Barr Virus Transactivator BZLF1 mRNA in Uncultured Peripheral Blood Lymphocytes by RT-Polymerase Chain Reaction. *Cell and Mol Life Sciences* 1994; 50: 796
91. Prang N, Hornef MW, Jäger M, Wagner HJ, Wolf H und Schwarzmann F: Lytic replication of Epstein-Barr Virus in the peripheral blood: Analysis of viral gene expression in B lymphocytes during infectious mononucleosis and in the normal carrier state. *Blood* 1997; 89: 1665-1677
92. Preiksaitis JK und Cockfield SM: Epstein-Barr Virus and Lymphoproliferative Disease after Hemopoetic Stem-Cell or Solid Organ Transplantation. In: Bowden RA, Ljungman P und Paya CV: *Transplant Infections*. 2. Aufl., 326-349, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia 2003
93. Qu L und Rowe DT: Epstein-Barr Virus Latent Gene Expression in Uncultured Peripheral Blood Lymphocytes. *J Virol* 1992; 66: 3715-3724
94. Randhawa PS, Demetris AJ, Peitzak B, Nalesnik MA: Histopathology of Renal Posttransplant Lymphoproliferation: Comparison with rejection Using the Banff Schema. *Am J Kidney Dis* 1996; 28: 578-584

95. Randhawa PS, Magnone M, Jordan M, Shapiro R, Demetris AJ und Nalesnik MA: Renal Allograft Involvement by Epstein-Barr Associated Post-Transplant Lymphoproliferative Disease. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 563-571
96. Reding R, Wallemacq PR, Lamy ME, Rahier J, Sempoux C, Debande B, Jamart J, Barker A, Sokal E und de Ville de Goyet J: Conversion from Cyclosporin to FK506 for Salvage of Immunocompromised Pediatric Liver Allografts. Efficacy, Toxicity, and Dose Regimen in 23 Children. *Transplantation* 1994; 57: 93-100
97. Reisman D, Yates J und Sugden B: A Putative Origin of Replication of Plasmids Derived from Epstein-Barr Virus is Composed of Two Cis-Acting Components. *Mol Cell Biol* 1985; 5: 1822-1832
98. Rickinson AB und Kieff E: Epstein-Barr Virus. In: Fields BN, Knipe DM und Howley PM: *Field's Virology*. 3. Aufl., 2397-2446, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996
99. Riddler SA, Breinig MC und McKnight JLC: Increased Levels of Circulating Epstein-Barr Virus (EBV) Infected Lymphocytes and Decreased EBV Nuclear Antigen Antibody Responses are Associated with the Development of Posttransplant Lymphoproliferative Disease in Solid Organ Transplant Recipients. *Blood* 1994; 84: 972-984
100. Roizman B: The Function of Herpes Simplex Virus Genes: A Primer for Genetic Engineering of Novel Vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 11307-11312
101. Rooney CM, Smith CA, Ng CY, Loftin S, Li C, Krance RA, Brenner MK und Heslop HE: Use of Gene-Modified T-Lymphocytes to Control Epstein-Barr-Virus Related Lymphoproliferation. *Lancet* 1995; 345: 9-13
102. Rowe DT, Qu L, Reyes J, Jabbour N, Yunis E, Putnam P, Todo S und Green M: Use of Quantitative Competitive PCR to Measure Epstein-Barr Virus Genome Load in the Peripheral Blood of Pediatric Transplant Recipients with Lymphoproliferative Disorders. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1612-1615
103. Rowe DT, Webber S, Schauer EM, Reyes J, Green M: Epstein-Barr virus load monitoring: its role in the prevention and management of post-transplant lymphoproliferative disease. *Transpl Infect Dis* 2001; 3: 79-87
104. Rowe M, Niedobitek G und Young LS. Epstein-Barr Virus Gene Expression and Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders. *Springer Semin Immunopathol* 1998; 20: 389-403
105. Savoldo B, Goss J, Liu Z, Huls MH, Doster S, Gee AP, Brenner MK, Heslop HE und Rooney CM: Generation of Autologous Epstein-Barr Virus-Specific Cytotoxic T cells for Adoptive Immunotherapy in Solid Organ Transplant Recipients. *Transplantation* 2001; 72: 1078-1086
106. Shapiro R, Nalesnik M, McCauly J, Fedorek S S, Jordan ML, Scantlebury VP, Jain A, Vivas C, Ellis D, Lombardozi-Lane S, Randhawa P, Johnston J, Hakala TR, Simmons RL, Fung JJ und Starzl TE: Posttransplant Lymphoproliferative Disorders

- in Adults and Pediatric Renal Transplant Recipients Receiving Tacrolimus-Based Immunosuppression. *Transplantation* 1999; 68: 1851-1854
107. Sinclair AJ, Palmero I, Peters G und Farrell PJ: EBNA-2 und EBNA-LP Cooperate to Cause G0 to G1 Transition During Immortalization of Resting Human B-Lymphocytes by Epstein-Barr Virus. *EMBO J* 1994; 13: 3321-3328
  108. Sixbey JW, Davis DS, Young LS, Hutt-Fletcher L, Tedder TF und Rickinson AB: Human Epithelial Cell Expression of an Epstein-Barr Virus Receptor. *J Gen Virol* 1987; 68: 805-811
  109. Sokal EM, Antunes H, Beguin C, Bodeus M, Wallemacq P, de Ville de Goyet J, Reding R, Janssen M, Buts JP und Otte JB : Early Signs and Risk Factors for the Increased Incidence of Epstein-Barr Virus-Related Posttransplant Lymphoproliferative Diseases in Pediatric Liver Transplant Recipients Treated with Tacrolimus. *Transplantation* 1997; 64: 1438
  110. Starzl TE: Five Years's Experience in Renal Transplantation with Immunosuppressive Drugs: Survival, Function, Complications and the Role of Lymphocyte Depletion by Thoracic Duct Fistula. *Ann Surg* 1968; 168: 419
  111. Starzl TE, Nalesnik M, Porter KA, Ho M, Iwatsuki S, Griffith BP, Rosenthal JT, Hakala TR, Shaw BW Jr und Hardesty RL: Reversibility of Lymphomas and Lymphoproliferative Lesions Developing under Cyclosporin-Steroid Therapy. *Lancet* 1984; 1: 583-587
  112. Stevens SJ, Verschuuren EA, Pronk I, van der Bij W, Harmsen MC, The H, Meijer CJLM, van den Brule AJC und Middeldorp JM: Frequent Monitoring of Epstein-Barr Viral Load in Unfractionated Whole Blood is Essential for Early Detection of Posttransplant Lymphoproliferative Disease in High-Risk Patients. *Blood* 2001; 97: 1165-1171
  113. Stevens SJ, Verschuuren EA, Verkuujlen SA, van den Brule AJC, Meijer CJ und Middeldorp JM: Role of EBV DNA Load Monitoring in Prevention and Early Detection of PTLD. *Leuk Lymphoma* 2002; 43: 831-840
  114. Swinnen LJ, Costanzo-Nordin MR, Fisher SG, O'Sullivan EJ, Johnson MR, Heroux AL, Dizikes GJ, Pifatte R und Fisher RI: Increased Incidence of Lymphoproliferative Disorder after Immunosuppression with the Monoclonal Antibody OKT3 in Cardiac-Transplant Recipients. *N Engl J Med* 1990; 323: 1723-1728
  115. Tanner J, Weis J, Fearon D, Whang Y und Kieff E: Epstein-Barr Virus gp350/220 Binding to the B-Lymphocyte C3d Receptor Mediates Adsorption, Capping and Endocytosis. *Cell* 1987; 50: 203-213
  116. Thorley-Lawson DA und Gross A: Persistence of the Epstein-Barr Virus and the Origins of Associated Lymphomas. *N Engl J Med* 2004; 350: 1328-1337
  117. Thorley-Lawson DA, Miyashita EM und Kahn G: Epstein-Barr Virus and the B-Cell: That's All it Takes. *Trends Microbiol* 1996; 4: 204

118. Tsang SF, Wang F, Izumi KM und Kieff E: Delineation of the Cis-Acting Element Mediating EBNA-2 Transactivation of Latent Infection Membrane Protein Expressoin. *J Virol* 1991; 65: 6565-6571
119. Vajro P, Lucariello S, Migliaro F, Sokal E, Gridelli B, Vegnente A, Iorio R, Smets F, Quinto I und Scala G: Predictive Value of Epstein-Barr Virus Genome Copy Number and BZLF1 Expression in Blood Lymphocytes of Transplant Recipients at Risk for Lymphoproliferative Disease. *J Infect Dis* 2000; 181: 2050-2054
120. Van Esse JW, Niesters HG, van der Holt B, Meijer E, Osterhaus AD, Gratama JW, Verdonck LF, Lowenberg B und Cornelissen JJ: Prevention of Epstein-Barr Virus Lymphoproliferative Disease by Molecular Monitoring and Preemptive Rituximab in High-Risk Patients after Allogeneic Stem-Cell Transplantation. *Blood* 2002; 99: 4364-4369
121. Wagner HJ, Wessel M, Jabs W, Smets F, Fischer L, Offner G, Bucsky: Patients at Risk for Development of Posttransplant Lymphoproliferative Disorder: Plasma versus Peripheral Blood Mononuclear Cells as Material for Quantification of Epstein- Barr Viral Load by Using Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction. *Transplantation* 2001; 72: 1012-1019
122. Wagner HJ, Fischer L, Jabs W, Holbe M, Pethig K und Bucsky P: Longitudinal Analysis of Epstein-Barr Viral Load in Plasma and Peripheral Blood Mononuclear Cells of Transplanted Patients by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Transplantation* 2002; 74: 656-664
123. Wagner HJ, Jabs W, Smets F, Wessel M, Fischer L, Offner G, Kirchner H, Bucsky P: Real-Time Polymerase Chain Reaction (RQ-PCR) for the Monitoring of Epstein-Barr Virus (EBV) Load in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Klein Pädiatr* 2000; 212: 206-210
124. Wagner HJ, Bein G, Bitsch A, Kirchner H: Detection and Quantification of Latently Infected B Lymphocytes in Epstein-Barr Virus-Seropositive, Healthy Individuals by Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30; 2826-2829
125. Wang D, Liebowitz D und Kieff E: An EBV Membrane Protein Expressed in Immortalized Lymphocytes Transforms Established Rodent Cells. *Cell* 1985; 43: 831-840
126. Webster-Cyraque J, Middeldorp JM und Raab-Traub N: Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 Underlies the Pathology of Oral Hairy Leukoplakia: an Unusual Combination of Transformation and Permissive Infection. *J Virol* 2000; 74: 7610-7618
127. Wildy P und Watson DH: Electron microscopic Studies on the Architecture of Animal Viruses. *Spring Harbour Symp Quant Biol* 1963; 27: 25-47
128. Wilson JB und Levine AJ: Expression of the Epstein-Barr virus Nuclear Antigen-1 Induces B-Cell Neoplasia in Transgenic Mice. *The EMBO Journal* 1996; 15: 3117-3126

129. Yamamoto M, Kimura H, Hironaka T, Hirai K, Hasegawa S, Kuushima K, Shibata M und Morishima T: Detection and Quantification of Virus DNA in Plasma of Patients with Epstein-Barr Virus-Associated Diseases. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1765-1768
130. Yang J, Lemas VM, Flinn IW, Krone C und Ambinder RF: Application of ELISPOT Assay to the Characterization of CD8(+) Responses to Epstein-Barr Virus Antigens. *Blood* 2000; 95: 241-248
131. Yang J, Tao Q, Flinn IW, Murray PG, Post LE, Ma H, Piantadosi S, Caligiuri MA und Ambinder RF: Characterization of Epstein-Barr Virus Infected B-Cells in Patients with Posttransplantation Lymphoproliferative Disease: Disappearance after Rituximab Therapy does not Predict Clinical Response. *Blood* 2000; 96: 4055-4063
132. Young LS, Dawson CW, Brown KW und Rickinson AB: Identification of a Human Epithelial Cell Surface Protein Sharing an Epitope with the Cd3/Epstein-Barr Virus Receptor Molecule of B-Lymphocytes. *Int J Cancer* 1989; 43: 786-794
133. Zutter MM, Martin PJ, Sale GE, Shulman HM, Fisher L, Thomas ED und Durnam DM: Epstein-Barr Virus Lymphoproliferation after Bone Marrow Transplantation. *Blood* 1988; 72: 520-529



Ganz herzlich möchte ich mich bei PD Dr. med. Wagner und Herrn Prof. Dr. med. Bucky für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung bedanken.

Vielen Dank an A. Sewe für die ausdauernde und tolle Hilfe und Beantwortung vieler Fragen bei den experimentellen und technischen Teilen.

Lebenslauf

21.10.1981            Geburt in Hamburg

**Schulausbildung:**

1988-1992            Grundschule Strenge in Hamburg

1992-2001            Gymnasium Oberalster in Hamburg

1998/1997            Auslandsaufenthalt mit Besuch der High School, in Jefferson, NY,  
USA

2001                    Abitur

**Studium:**

2001                    Beginn des Medizinstudium an der Medizinischen Universität zu  
Lübeck

09/2003                Physikum

2004                    Frühjahr:      Famulatur in der Abteilung für Anästhesie des  
UKSH/Lübeck

Sommer:      Famulatur in der orthopädischen Praxis von Dr.  
Schmidt in Hamburg

12/2004                Beginn der Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof.  
Bucsky zu EBV assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen  
nach Transplantation bei Kindern

2005                    Sommer:      Famulatur in Radiologie der Sana-Kliniken in Lübeck  
Famulatur in der Abteilung für Innere Medizin  
(Onkologie) des UK-SH/Lübeck

2006-2007 PJ in      1. Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Itzehoe  
2. Abteilung für Innere Medizin, Krankenhaus Grosshansdorf  
3. Abteilung für Chirurgie, Sana Kliniken Lübeck GmbH

09/2007                2. Ärztliche Prüfung

02/08                   Weiterbildungsassistentin in der Klinik für Kinder- und  
Jugendmedizin, Itzehoe