

Institut für Virologie und Antivirale Therapie
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. P. Wutzler)
der FSU Jena

Nachweis von Herpesvirus *Macaca arctoides* im Kaninchen-Tumor-Modell

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades *doctor medicinae*
(Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von stud. med. Christoph Böttcher
geboren am 29.01.1979 in Erfurt

Jena 2004

Gutachter 1.....

Gutachter 2.....

Gutachter 3.....

Tag der öffentlichen Verteidigung:

Verzeichnis der Abkürzungen:

AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
bp	base pairs (Basenpaare)
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EA	early antigen (Frühantigen)
EBER	Epstein-Barr-Virus-Encoded-RNA
EBNA	Epstein-Barr-Virus-Nuklear-Antigen (Kernantigen)
EBV	Epstein-Barr-Virus
HIV	human immunodeficiency virus (humanes Immunschwächevirus)
HVMA	Herpesvirus Macaca arctoides
LMP	latentes Membranprotein
MA	Membran-Antigen
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PTLD	posttransplanted lymphoproliferative disease (Postransplantations-lymphoproliferative Erkrankung)
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
VCA	virus capsid antigen (Viruskapsidantigen)

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	3
2.1.	Die Epidemiologie der Epstein-Barr-Virus-Infektion	3
2.2.	Virusreplikation	4
2.3.	EBV-assoziierte Erkrankungen	8
2.4.	Antivirale Therapie	12
2.5.	EBV-Tiermodelle	14
3.	Ziele der Arbeit	18
4.	Material und Methoden	19
4.1.	Untersuchungsmaterial	19
4.2.	Zellkulturen	21
4.3.	Untersuchungsmethoden	23
4.3.1.	DNA-Extraktion	23
4.3.2.	Messung der DNA-Konzentration	24
4.3.3.	Herstellung der Verdünnungsreihen und Standards	25
4.3.4.	PCR	25

4.3.5.	Berechnung der HVMA-Genom-Kopien	29
4.3.6.	Sondenpräparation	30
4.3.7.	Southern-Blot-Hybridisierung	32
4.4.	Rezepturen und Reagenzien	34
5.	Ergebnisse	41
5.1.	Patienten mit infektiöser Mononukleose	41
5.2.	Tierexperimente	43
5.2.1.	Klinischer Verlauf, makroskopische und mikroskopische Befunde	43
5.2.2.	Ergebnisse der HVMA-PCR mit Plasma-DNA	48
5.2.2.1.	Vergleich beider Testgruppen (Cidofovir vs. PBS)	50
5.2.2.2.	Vergleich zwischen Tieren mit und ohne Tumor	50
5.2.3.	Ergebnisse der qualitativen HVMA-PCR mit Leukozyten-DNA	53
5.2.3.1.	Vergleich beider Testgruppen (Cidofovir vs. PBS)	56
5.2.3.2.	Vergleich zwischen Tieren mit und ohne Tumor	56
5.2.4.	Ergebnisse der quantitativen HVMA-PCR mit Leukozyten-DNA	58
5.2.4.1.	Vergleich beider Testgruppen (Cidofovir vs. PBS)	67

5.2.4.2.	Vergleich zwischen Tieren mit und ohne Tumor	68
5.2.5.	Ergebnisse des Virusnachweises im Kaninchengewebe	70
5.2.5.1.	Vergleich beider Testgruppen (Cidofovir vs. PBS)	73
5.2.5.2.	Vergleich zwischen Tieren mit und ohne Tumor	73
6.	Diskussion	78
7.	Schlussfolgerungen	92
8.	Literaturverzeichnis	94
9.	Anhang	122
	- Danksagung	
	- Lebenslauf	
	- Ehrenwörtliche Erklärung	

1. Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Dissertation wurden Arbeiten, die am Institut für Virologie und Antivirale Therapie der Friedrich-Schiller-Universität Jena im Rahmen des Projektes „Prävention und Therapie EBV-assoziiierter lymphoproliferativer Erkrankungen durch selektive Virustatika und Impfstoffe in einem EBV-like (HVMA) Kaninchenmodell“ im Verbund für klinische Forschung (VKF) begonnen wurden, fortgeführt. In einem Teilprojekt war das neue Virustatikum Cidofovir an insgesamt 14 Kaninchen getestet worden. Dabei wurden nach Infektion mit dem Herpesvirus *Macaca arctoides* (HVMA), das mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) verwandt ist, sechs Tiere mit Cidofovir (Dosierung: 5 mg/kg/Woche) und fünf Tiere mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) behandelt. Zwei weitere Kaninchen erhielten nur Cidofovir und ein Kaninchen wurde als Kontrolle weder infiziert noch behandelt. Die Versuche erstreckten sich über 24 Wochen. Grundlage für die experimentellen Arbeiten der Dissertation bildeten je 279 Plasma- und Leukozyten- sowie 83 Gewebeproben, die von diesen Kaninchen im Versuchsverlauf gewonnen und konserviert worden waren. Die Proben wurden mittels qualitativer und zur Bestimmung der Anzahl der Virus-Genom-Kopien in den Leukozyten auch mittels quantitativer PCR und nested PCR unter Verwendung von Primern aus der Polymerasegenregion des EBV untersucht. Die Untersuchung der Gewebeproben erfolgte semiquantitativ mit PCR und Southern-Blot-Hybridisierung.

Neun der elf infizierten Versuchstiere entwickelten maligne Lymphome, die histomorphologisch mit menschlichen Non-Hodgkin-Lymphomen hohen Malignitätsgrades vergleichbar sind. Bezüglich der virologischen Parameter war der Infektionsverlauf in den ersten drei Wochen unabhängig davon, ob die Tiere mit PBS oder mit Cidofovir behandelt wurden und ob sie später einen Tumor entwickelten oder nicht, relativ identisch. So konnte bei allen mit HVMA infizierten Tieren HVMA-DNA in den Leukozyten schon in der zweiten Woche p.i. festgestellt werden, während dies im Plasma erst in der dritten Woche p.i. der Fall war. Der Nachweis von viraler DNA im Plasma spricht dafür, dass es bei allen Tieren nach der Primärinfektion zur lytischen Phase der Virusreplikation in den Leukozyten und damit zur Freisetzung von Viren ins Plasma kam. In den folgenden Versuchswochen waren sowohl eine Virämie als auch kontinuierlich HVMA-positive Leukozyten bei allen Tieren mit späterer Tumorentwicklung, ein Kaninchen ausgenommen, nachweisbar.

Unterschiede zwischen der Cidofovir- und der Placebogruppe bestanden nicht. Diese Ergebnisse bestätigen die klinische Beobachtung dahingehend, dass Cidofovir entgegen den Erwartungen ein Fortschreiten der Infektion nicht verhindern konnte. Cidofovir hatte aber auch keinen Einfluss auf die gemessenen virologischen Parameter in der Frühphase der Infektion, obwohl es *in vitro* die Virus-DNA-Synthese deutlich zu reduzieren vermag.

Bei den infizierten Kaninchen wurde von der zweiten bis zur vierten Versuchswoche eine deutlich höhere Anzahl von Virus-Genom-Kopien in den Leukozyten gemessen als in den folgenden Wochen. Das spricht für die in der Initialphase der Infektion besonders hohe Replikationsrate des Virus.

Auch im späteren Versuchsverlauf war kein Unterschied bezüglich der virologischen Befunde zwischen mit Cidofovir und den mit PBS behandelten Tieren feststellbar. Im Plasma und in den Leukozyten waren acht der elf Tiere durchgehend positiv. Nur zwei Kaninchen hatten, von kurzzeitigen virämischen Phasen abgesehen, keine Virämie. Bemerkenswert ist, dass diese beiden Tiere bis zum Versuchsende tumorfrei blieben, obwohl die Leukozyten meist HVMA-positiv waren. Diese Kaninchen waren offenbar in der Lage, die Infektion zumindest teilweise zu kontrollieren, so dass es nur selten zur Freisetzung von Viruspartikeln ins Plasma kam. Bei einem Kaninchen, bei dem ein Tumor erst während der Sektion diagnostiziert wurde, trat erst in der 22. und 23. Woche p.i. eine Virämie auf. Die Virus-Genom-Kopien stiegen während dieser Zeit in den Leukozyten um zwei bis drei Zehnerpotenzen an. Dies könnte als Hinweis auf eine im Vergleich zu den anderen Kaninchen verspätet einsetzende Tumorentwicklung zu werten sein, klinisch war das Tier bis zu diesem Zeitpunkt unauffällig.

Die wesentlichen Unterschiede zwischen den Tieren mit und ohne Tumor bestanden im Auftreten der Virämie und der Höhe der Virus-Genom-Kopien in den Leukozyten. Die Tiere mit Tumorbildung waren im Plasma in der Regel HVMA-positiv und wiesen über 1000 HVMA-Genom-Kopien/10⁵ Leukozyten auf. Im Gegensatz dazu konnte bei den Kaninchen ohne Tumorbildung im Plasma nur selten Virus-DNA nachgewiesen werden und die Anzahl der Virus-Genom-Kopien lag unter 1000/10⁵ Zellen oder unterhalb der Nachweisgrenze. Außerdem wiesen die Kaninchen mit Lymphomen im Tumorgewebe stets HVMA-DNA auf, während bei den Tieren ohne Tumor nur geringe Mengen oder keine Virus-DNA in den Organen gefunden wurde.

2. Einleitung

2.1. Die Epidemiologie der Epstein-Barr-Virus-Infektion

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) wurde 1964 durch M.A. Epstein, B.G. Achong und Y.M. Barr in krebsartig veränderten B-Zellen eines Patienten mit Burkitt-Lymphom entdeckt (Epstein et al., 1964, 1965). Werner und Gertrude Henle (1968) identifizierten das EBV später als ätiologisches Agens der infektiösen Mononukleose. Das EBV ist ein besonders häufig vorkommendes humanpathogenes Virus, welches von der IARC (International agency for research on cancer) als Gruppe I Karzinogen klassifiziert worden ist. In den Industrieländern sind mehr als 90% aller Personen über 25 Jahre infiziert, wobei rund 50% der Bevölkerung sich schon in den ersten fünf Lebensjahren infiziert und erst später bei Jugendlichen die Infektionsrate erneut steil ansteigt (Lennette, 1990; Mayer et al., 1993). Im Gegensatz dazu beträgt die Durchseuchungsrate bei Kindern in Entwicklungsländern fast 100%. Deshalb kann angenommen werden, dass sich das Alter zum Zeitpunkt der Primärinfektion umgekehrt proportional zum sozialen Status verhält (Wolf und Seibl, 1984).

Die Übertragung der Viren erfolgt hauptsächlich über den Speichel. Das Virus wird vorwiegend durch latent infizierte auf seronegative Personen übertragen (Heath et al., 1972; Henle W und Henle G, 1979a, 1979b; Sumaya und Ench, 1986).

Taxonomie und Molekularbiologie

Das Epstein-Barr-Virus gehört zur Familie der Herpesviridae, einer heterogenen Familie, die aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften wie Zelltropismus, Neigung zu lytischer Infektion, Persistenz und Tumorgenese in drei Gruppen unterteilt wird: 1. Alphaherpesvirinae, 2. Betaherpesvirinae, 3. Gammaherpesvirinae. Das EBV gehört wie einige andere Primatenherpesviren der letzten Subfamilie, den Gammaherpesvirinae an, und wird der Gattung Lymphocryptovirus zugeordnet.

Es hat eine Viriongröße von 150 bis 200 nm und besitzt ein ikosaedrisches Kapsid, das aus 162 Kapsomeren und einem Kern mit linear doppelsträngiger DNA aufgebaut ist (Wildy und Watson, 1963; Furlong et al., 1972). Umhüllt wird das Kapsid von einer aus Proteinen bestehenden Tegumentschicht. Die äußerste Schicht ist die Virusmembran, die Glykoproteine enthält (Roizman et al. 1996; Levy, 1995). Das Genom des EBV, welches eine Gesamtlänge von 170 kb hat, wurde von Baer et

al. (1984) vollständig sequenziert. Die DNA ist in den Virionen linear angeordnet, liegt aber in latent infizierten Zellen meist zirkulär episomal vor.

Das EBV infiziert initial Epithelzellen und B-Lymphozyten im Oropharyngealtrakt und führt zu einer lebenslangen Virusproduktion in den Speicheldrüsen und Rachenepithelien (Wolf et al., 1984). Die infizierten Epithelzellen wurden lange als der Hauptort der lytischen Virusvermehrung vermutet. In neuen Studien zeigte sich allerdings, dass epithelständige B-Lymphozyten als primärer Replikationslokalität fungieren (Sixbey et al., 1984; Anagnostopoulos et al., 1995; Rickinson und Kieff, 1996). Die Anzahl dieser Zellen bleibt über Jahre hinweg stabil. Sie wird mit ca. 1-50 pro 10^6 Zellen im peripheren Blut angegeben (Birx et al., 1986; Gratama et al., 1988; Yao et al., 1989; Babcock et al., 1998). Das Immunsystem ist in der Lage, alle die Zellen, die mehr als nur EBNA-1 exprimieren, durch zytotoxische T-Zellen zu beseitigen. Deshalb bleibt die Produktion von EBV-Virionen im Körper auf Gewebe beschränkt, die dem Immunsystem nicht oder kaum zugänglich sind, wie z.B. Parotis oder Uterusmucosa (Wolf et al., 1984; Greenspan et al., 1985; Sixbey et al., 1986). Das Virus persistiert im Körper durch die latente Infektion von B-Lymphozyten, Knochenmark- und Epithelzellen (Gratama et al., 1988; Niedobitek und Young, 1994). Tao und Robertson (2003) sind der Auffassung, dass für die Aufrechterhaltung der Viruspersistenz die Methylierung von bestimmten Promotorregionen der DNA eine entscheidende Rolle spielt. Bei immunsupprimierten Patienten findet die Elimination der EBV-positiven Zellen nur noch teilweise statt, so dass es zu Erkrankungen kommt, die in Zusammenhang mit dem lytischen Zyklus oder der Transformation von Zellen (lymphoproliferative Erkrankungen) durch EBV stehen.

2.2. Virusreplikation

Durch zwei völlig verschiedene Vermehrungsstrategien ist das EBV einerseits in der Lage, in der lytischen Phase infektiöse Viruspartikel freizusetzen und andererseits durch latente Infektion der Wirtszellen wie alle Herpesviren dauerhaft im Organismus zu überleben. Phasen der Latenz wechseln sich mit Phasen der lytischen Infektion in Abhängigkeit vom Immunstatus des Wirts und den exprimierten viralen Genprodukten ab. Die lytische Infektion dient der Produktion von infektiösen Viruspartikeln, während durch die latente Infektion ein Ruhezustand etabliert wird,

der sich der immunologischen Kontrolle des Wirtsorganismus entzieht. Auf diese Weise steht ein permanentes Virusreservoir zur Verfügung, welches jederzeit reaktiviert und in die produktive Phase übergehen kann. In fast allen Tumoren ist EBV nur in latenter Form zu finden, d.h. Virionen werden nicht produziert.

Für die Adsorption von EBV an die Wirtszellen ist der auf B-Lymphozyten lokalisierte zelluläre CD-21 Komplementrezeptor verantwortlich, der mit dem viralen gp220/350 Glykoproteinkomplex interagiert (Fingerroth et al., 1984; Nemerow et al., 1987). Nach der Primärinfektion persistiert das Virus latent in menschlichen B-Lymphozyten, ohne einen vollständigen lytischen Zyklus zu durchlaufen (Rea et al., 1994; Martel-Renoir et al., 1995). Nach Abklingen der Primärinfektion aber ist eine Reaktivierung der Viren aus den latent infizierten B-Zellen durch Übergang in den lytischen Zyklus jederzeit möglich und führt so zur endogenen Reinfektionen der Epithelzellen. Deshalb kann es auch lange nach der Primärinfektion zur Virusausscheidung im Speichel kommen (Gratama et al., 1990; Kieff, 1995a, 1995b).

Der lytische Zyklus

Nach Reaktivierung der latenten EBV-Genome kommt es zur lytischen Phase mit kaskadenartiger Expression von ca. 15-20 „early antigens“ (EA) und anschließender Bildung von Viruskapsidantigenen (VCA) und Membranproteinen (MA) (Ooka, 1985). Die Transkription von rund 100 viralen Genen erfolgt in drei unterschiedlichen Phasen (Baer et al., 1984):

1. sehr frühe Phase (IE = immediate early)
2. frühe Phase (E = early)
3. späte Phase (L = late).

In der ersten Phase kommt es zur Umstellung von der latenten Genexpression auf die lytische Kaskade, gesteuert durch die „sehr frühen Virusproteine“, die die Gene der Latenz supprimieren und die der 2. Stufe („early“) aktivieren (Kenney et al., 1989). Ihre Synthese ist unabhängig vom Auftreten anderer Faktoren. Beispiele für sehr frühe Genprodukte sind BZLF-1 (Zta; ZEBRA), BRLF-1 (Rta) und BBLF-4 (Ita). Zta nimmt hierbei eine Sonderstellung ein, denn es ist das einzige EBV-Genprodukt, das ohne Hilfe anderer Faktoren in B-Lymphozyten die Latenz beenden kann (Countryman et al., 1987; Grogan et al., 1987). Die sehr frühen viralen Proteine besitzen transaktivierende Funktionen, die auf die Expression zellulärer und viraler

Proteine gerichtet sind. Die produzierten frühen Proteine (EA) fungieren als virale Enzyme und werden für die DNA-Replikation in der lytischen Phase benötigt. Zu ihnen gehören die DNA-Polymerase, die Thymidinkinase, die alkalische Exonuklease oder die Ribonukleotidreduktase. Zwischen der frühen und späten Phase findet die Replikation der viralen DNA statt. Späte Proteine sind hauptsächlich virale Strukturproteine (VCA, MA), die für den Aufbau von Kapsid, Tegumentschicht und Virusmembran benötigt werden, wie z.B. gp220/350, gp85, gp110 und das Protein p150 (VCA). Regulatorische oder enzymatische Proteine sind in der späten Phase nicht gefunden worden (Kieff und Liebowitz, 1990; Kieff, 1996).

Der lytische Infektionszyklus der Virusreplikation konnte *in vitro* auf verschiedenen Wegen ausgelöst werden (Luka et al., 1979; Bauer et al., 1982; Mellinghof et al., 1991).

Der latente Zyklus

In der Latenzphase kommt es zu keiner Produktion von infektiösen Viruspartikeln. Dabei wird das als extrachromosomales Episom im Kernplasma liegende EBV-Genom parallel mit dem Genom der Wirtszelle repliziert und so an die Tochterzellen weitergegeben. Typisch für diese Phase sind bestimmte exprimierte Proteine wie die Kernantigene (EBNA 1-6) und die latenten Membranantigene (LMP-1, LMP-2) (Sadler und Raab-Traub, 1995; Fries et al., 1997; Kienzle et al., 1999). Diese Proteine immortalisieren die infizierten B-Lymphozyten, d.h. sie können sich unendlich oft teilen und wachsen *in vitro* zu kontinuierlichen Zelllinien aus (Pope, 1967; Pope et al., 1967; Lewin et al., 1990). Die produzierten latenten Genprodukte steuern das Verhalten des Virus und der betroffenen Wirtszelle. Anhand ihrer Expression können verschiedene Latenzstadien unterschieden werden, die in Tabelle 1 aufgelistet sind. Die ersten viralen Genprodukte, die in latent infizierten Zellen nachgewiesen werden können, sind EBNA-2 und EBNA-LP (EBNA-5), wobei EBNA-2 und EBNA-3c absolut essentiell für die Immortalisierung der B-Zellen sind (Hammerschmidt und Sudgen, 1988, 1989; Cohen et al., 1989; Hitt et al., 1989; Alfieri et al., 1991; Tomkinson et al., 1993). Das später gebildete LMP-1 besitzt onkogenes Potential, weil es entscheidenden Einfluss auf die Apoptose der Epithelzellen hat (Wang et al., 1985, 1990a, 1990b; Fries et al., 1996; Kulchiwit et al., 1998). EBNA-1 wird in jeder EBV-infizierten Zelle exprimiert und sichert durch Aufrechterhaltung der episomalen Form des Genoms in der Zelle die Verteilung der

Virus-DNA auf die Tochterzellen (Middleton und Sudgen, 1992). Außerdem finden sich in latent infizierten Zellen noch zwei EBV-kodierte RNA-Transkripte (EBER 1 und EBER 2). Sie liegen sowohl im latenten als auch im lytischen Zyklus vor und befinden sich im Zellkern. Ihre genaue Regulation und immunologische Funktion ist noch unbekannt (Rosa et al., 1981; Howe und Steitz, 1986; Sharp et al., 1993).

In der ersten Phase der Latenz (Latenz 0) bleiben die nicht aktivierten B-Lymphozyten vom Immunsystem auf Grund der Bildung von LMP-2a, welches die Aktivierung durch den B-Zellrezeptor verhindert, unerkant (Burkhardt et al., 1992; Longnecker und Miller, 1996). Die Latenzphasen I und II sind durch spezifische Expressionsmuster latenter Genprodukte gekennzeichnet. Nach Aktivierung durch Antigen und T-Helferzellen können ruhende B-Zellen des Stadiums I in die Latenzstufe III übergehen, in der alle latenten Genprodukte exprimiert werden (Thorley-Lawson et al., 1996; Rowe, 1999).

Tabelle 1: Die unterschiedliche Expression viraler Proteine in den verschiedenen Phasen der EBV-Latenz

Latenztyp	EBNA 1	EBNA 2	EBNA 3	LMP1	LMP2	EBER	Vorkommen
0	+/-	-	-	-	+	+	Gesunde seropositive Personen
I	+	-	-	-	-	+	Burkitt-Lymphom
II	+	-	-	+/-	+	+	NPC, Hodgkin-Lymphom, T-Zell-Lymphom
III	+	+	+	+	+	+	Lymphoproliferative Erkrankungen, XLPS, infektiöse Mononukleose

- NPC = Nasopharyngealkarzinom

- XLPS = X-chromosomal gebundenes lymphoproliferatives Syndrom

2.3. EBV-assoziierte Erkrankungen

Infektiöse Mononukleose

Die infektiöse Mononukleose, auch „Pfeiffer’sches Drüsenfieber“ oder „kissing disease“ genannt, ist mit ihrer Symptomtrias Lymphadenopathie, Pharyngitis und Fieber die klassische durch EBV verursachte Erkrankung. Als weiteres Symptom tritt gehäuft eine Hepatosplenomegalie auf (Henle G und Henle W, 1979a, 1979b; Schooley und Dolin, 1990). Abhängig vom Alter steigt das Risiko eines frisch Infizierten, manifest zu erkranken (Bauer, 1992). Deshalb zeigen Kinder seltener einen klinisch apparenten Verlauf als Adoleszente und Erwachsene, bei denen eine Inzidenz von rund 50% angegeben wird. (Lehane, 1970; Sawyer et al., 1971; Hallee et al., 1974). Der Schweregrad der Erkrankung ist altersunabhängig. Bei der Mehrzahl der Patienten nimmt sie einen unauffälligen Verlauf und dauert ca. zwei bis sechs Wochen an. Nur bei ein 1-2% der Fälle kommt es zu Komplikationen wie Thrombozytopenie, Neutropenie, milde Formen aplastischer Krisen, sowie Atemwegsobstruktion durch Tonsillenvergrößerung (Grishaber et al., 1988).

Bei Patienten mit einem X-chromosomal gebundenen lymphoproliferativen Syndrom (Duncan-Syndrom; Purtillo-Syndrom) endet in 75% der Fälle eine primäre EBV-Infektion tödlich, weil die Kontrolle der Viruspartikelproduktion in den B-Zellen unterbleibt und es zu einer überschießenden Immunantwort unter Beteiligung von autoimmunen zytotoxischen T-Zellen kommt (Bar et al., 1974; Purtilo et al., 1975, 1982). Pathognomonisch für diesen Immundefekt sind geringe Antikörpertiter gegen EBV-Antigene; außerdem sind die Betroffenen immer männlichen Geschlechts. Überleben die Patienten die akute EBV-Infektion, entwickeln sie in 30% Hypo- und Agammaglobulinämien und in 25% maligne Lymphome (Schuster et al., 1993). Dagegen bereitet die chronische infektiöse Mononukleose langanhaltende, über sechs Monate andauernde Beschwerden.

Orale Haar-Leukoplakie

Die orale Haar-Leukoplakie ist eine benigne Hyperkeratose der Zunge, die bei 10-25% der HIV-positiven Patienten auftritt. Hierbei kommt es zur lytischen Produktion des EBV (Walling et al., 1995; Tsang und Samaranayake, 1999; Jensen et al., 2000; Patton, 2000).

Burkitt-Lymphom

Das afrikanische Burkitt-Lymphom ist ein vorwiegend zwischen dem sechsten und achten Lebensjahr auftretendes hochmalignes mittel- bis großzelliges Non-Hodgkin-Lymphom, welches in Zentralafrika und Papua-Neuguinea endemisch ist und mit dem Ausbreitungsgebiet der holoendemischen Malaria zusammen fällt (Burkitt, 1958). Die Malaria muss somit als Kofaktor bei der Entstehung des Burkitt-Lymphoms in Afrika angesehen werden, weil die Infektion mit *Plasmodium falciparum* die T-Lymphozyten supprimiert und gleichzeitig die EBV tragenden B-Lymphozyten im peripheren Blut stimuliert (Klein, 1979; Yates et al., 1984; Lenoir und Bornkamm, 1987; Lam et al., 1991).

Die Entstehung des Burkitt-Lymphoms wird in drei Schritten beschrieben. Nach der Darstellung von Klein (1979) besteht der erste Schritt in der EBV-induzierten Immortalisation von B-Lymphozyten im Anschluss an die primäre Infektion, gefolgt von einem zweiten Schritt, bei dem es zur Stimulation und Proliferation der EBV-genomtragenden Zellen kommt. Dieser Vorgang ist umweltabhängig. Klein (1979) macht die holoendemische Malaria für die chronische Proliferation der latent EBV-infizierten B-Zellen verantwortlich. Der letzte Schritt ist die reziproke Translokation zwischen Chromosom 8 und Chromosom 14 oder Chromosom 2 und Chromosom 22. Innerhalb der Bruchstellen befindet sich das zelluläre Onkogen *c-myc* (Chromosom 8) sowie die schweren (Chromosom 14) und leichten (Chromosom 22 lambda und Chromosom 2 kappa) Immunglobulinkettengene. Durch den Verlust der Regulatorgenkontrolle infolge der Translokation kommt es zur Aktivierung von *c-myc* und anderen Onkogenen wie *BCL6* (Akasaka et al., 1996). Dies führt zum Wachstum eines autonomen monoklonalen Tumors. Die Translokationen treten, wie schon von Fukuhara und Rowley (1978) vermutet, nicht zufällig auf, sondern werden durch spezifische Mechanismen reguliert (Haralambieva et al., 2003; Li et al., 2003). Im Gegensatz zu Klein (1979) definieren Lenoir und Bornkamm (1987) als initialen Schritt der Lymphomentstehung die Bildung lymphoider Zellen, die durch kontinuierliche immunologische Stimulation der B-Zellen infolge einer Malaria oder HIV-Infektion begünstigt wird. Im zweiten Schritt kommt es zu chromosomalen Translokationen in einigen B-Zellen, die sowohl *c-myc* als auch die Immunglobulinorte betreffen. Die Zellen werden erst im letzten Schritt vom EBV infiziert, was dann zur Lymphomentstehung führt. Gemeinsam ist beiden Theorien die Berücksichtigung von EBV-Infektion und chromosomaler Translokation als

Ursache der Tumorentstehung. Der Kieferbereich, das zentrale Nervensystem und das Abdomen sind die häufigsten Lokalisationen. In Biopsien lassen sich in 96% der Tumorzellen afrikanischer Burkitt-Lymphome EBV-Genom-Kopien nachweisen, während bei der seltenen sporadischen Form des Burkitt-Lymphoms außerhalb Afrikas eine EBV-Positivität von nur 25-30% gefunden wurde (zur Hausen et al., 1970; Nonoyama und Pagano 1973; Nonoyama et al., 1973; Wutzler et al., 1980). Da bis heute die Vorgänge des malignen Tumorwachstums nicht vollständig geklärt werden konnten, existieren verschiedene Erklärungs- und Forschungsansätze (Wolf und Seibl, 1984).

Nasopharyngealkarzinom

Die histologisch undifferenzierte Form des nasopharyngealen Karzinoms ist mit einer Inzidenz von 40 Neuerkrankungen auf 100.000 Personen der häufigste epitheliale Tumor in Südostasien (Simons, 1982). Das höchste Neuerkrankungsrisiko besteht zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr. Bei der Entstehung spielen Umweltfaktoren (Ernährung), genetische Prädisposition (HLA-Typen) sowie epidemiologische Faktoren eine entscheidende Rolle (Wolf und Seibl, 1984). Für die hohen Erkrankungszahlen in bestimmten Gebieten wird auch ein Zusammenhang zwischen der EBV-Aktivierung und einigen in der asiatischen Medizin verwendeten Stoffen wie Bromeliaceen und Euphorbiaceen vermutet. Weltweit macht das Nasopharyngealkarzinom etwa 0,3-1% aller Malignome aus. In Biopsien wurde nachgewiesen, dass alle Tumorzellen des Nasopharyngealkarzinoms EBV-DNA tragen (Wolf et al., 1973). Dennoch ist unklar, auf welchem Wege es zur Infektion der Epithelzellen kommt. Hier werden verschiedene Theorien wie die Expression von EBV-Rezeptoren durch undifferenzierte Epithelzellen, Fusion von Epithelzellen mit infizierten B-Lymphozyten oder die Bildung von EBV/IgA-Komplexen diskutiert (Bayliss und Wolf, 1984; Li et al., 1992; Sixbey und Yao, 1992).

Serologisch fallen die Patienten durch hohe IgG- und IgA-Titer gegen das Kapsid-(VCA) und gegen Frühantigene des EBV auf (Wilmes et al., 1981).

Lymphoproliferative Erkrankungen

Nach Organtransplantationen kann es zu lymphoproliferativen Erkrankungen (PTLD= Posttransplantations-lymphoproliferative Erkrankung) und Lymphomen in verschiedenen Organen kommen, die EBV-assoziiert sind (Hanto et al., 1985; Lucas et al., 1998; Davis et al., 1999; Orii et al., 2000). Zurzeit ist ein Anstieg der Inzidenz solcher EBV-assoziiierter Erkrankungen nachzuweisen (Okano und Gross, 2000). Die Ursache hierfür ist im allgemeinen Anstieg erfolgreicher Transplantationen, besonders von Knochenmarktransplantationen (KMT), und der verlängerten Überlebenszeit immunsupprimierter Patienten (AIDS) zu sehen. Seronegative Empfänger haben ein besonders hohes Risiko, eine lymphoproliferative Erkrankung nach einer Transplantation zu entwickeln (Walker et al., 1995; Haque et al., 1996; Srivastava et al., 1999).

Aufgrund der Immunsuppression nach Knochenmarktransplantation oder anderen Organtransplantationen bzw. durch den Verlust an funktionsfähigen T-Helferzellen (fehlende T-Zellimmunität) mit Absinken des T-Helferzellen/T-Suppressorzellen-Quotienten bei AIDS-Patienten kommt es zu Fehlfunktionen der zellulären Abwehrmechanismen und zur Reaktivierung der latent mit EBV infizierten B-Lymphozyten. Das ist eine mögliche Ursache für die vermehrte Lymphomentstehung bei diesen Patienten (Brandt et al., 1998).

Weitere Erkrankungen mit EBV-Assoziation

Es existieren Hinweise auf einen kausalen Zusammenhang zwischen der EBV-Infektion und der Entstehung von Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen sowie von T-Zell-Lymphomen (Jones et al., 1988). Zum Beispiel wurde EBV-DNA in „Reed-Sternberg-Zellen“ nachgewiesen, die zwar nur 1% der Tumormasse ausmachen, aber pathognomonisch für das Hodgkin-Lymphom sind (Pallesen, 1992).

Auch bei anderen epithelialen Tumoren wie dem Tonsillenkarzinom, dem supraglottischen Larynxkarzinom, dem Adenokarzinom des Magenfundus, dem Mammakarzinom und bei Thymuskarzinomen wird eine EBV-Beteiligung aufgrund des wiederholten molekularbiologischen Nachweises von EBV-DNA im Tumorgewebe diskutiert (Brichacek et al., 1983, 1984; Leyvraz et al., 1985; Fukayama et al., 1994; Osato und Imai, 1996; Magrath und Bhatia, 1999).

2.4. Antivirale Therapie

Bei in vitro-Untersuchungen konnte eine deutliche antivirale Potenz von Aciclovir gegenüber EBV nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse wurden mit anderen Nukleosid-Analoga wie Penciclovir, Ganciclovir, Cidofovir und 3'-Azido-3'-Desoxythymidin (AZT) erzielt (Colby et al., 1980; Pagano et al., 1983; Cheng et al., 1983; Lin et al., 1984, 1986; Andersson, 1987 et al.; Lin und Machida, 1988; Lin et al., 1988, 1991a, 1991b).

In anderen Studien ergab der Vergleich der anti-EBV-Aktivität von neuen Nukleosiden und Nukleotiden mit der Wirkung von Aciclovir, Ganciclovir und Cidofovir eine signifikant höhere Effizienz und Selektivität (Meerbach et al., 1998). Eine neue Produktgruppe stellen die von Aciclovir abgeleiteten cyclo-Sal-Pro-Nukleotide dar, die in vitro die Replikation von HSV-1 und die EBV-DNA-Synthese hemmten (Meerbach et al., 2000a, 2000b). Andere halogenisierte Nukleosid-Analoga wie FIAU (1,2-Fluor-2-desoxy-beta-D-arabinofuranosyl-5-ioduridin), FIAC (1,2-Fluor-2-desoxy-beta-D-arabinofuranosyl-5-iodcytosin) und FMAU (1,2-Fluor-2-desoxy-beta-D-arabinofuranosyl-5-methyluridin) erwiesen sich zwar als wirksam gegen EBV, zeigten aber gleichzeitig eine hohe Zytotoxizität (Lopez et al., 1980).

Klinische Studien mit antiviralen Medikamenten

Die Behandlung von EBV-Infektionen ist schwierig. Deswegen mangelt es derzeit an einer allgemein gültigen Therapieempfehlung. Aciclovir i.v. reduziert die Virus-Sekretion im Oropharynx während der Behandlungsperiode bei infektiöser Mononukleose, aber eine Verbesserung der Symptomatik der Patienten konnte nicht erzielt werden. Dies gilt auch für die Therapie mit Ganciclovir (Pagano et al., 1983; Andersson et al., 1986; van der Horst et al., 1991; Ishida et al., 1993). Eine Kombinationstherapie von Aciclovir und Interferon-Gamma erwies sich ebenfalls als erfolglos (Meier und Straus, 1992; Meier, 1992).

Bewährt hat sich Aciclovir bei der Therapie der oralen Haar-Leukoplakie, bei der eine deutliche Besserung der Symptome erzielt werden konnte, auch wenn es zu Rezidiven nach Absetzen der Medikamente kam (Herbst et al., 1989; Greenspan et al., 1990). Hier ist die Wirksamkeit von Aciclovir auf das Vorliegen von EBV in der lytischen Form zurückzuführen (Ochsendorf et al., 1988; Resnick et al., 1988;

Greenspan und Greenspan, 1989). Ähnliche Ergebnisse wurden mit Ganciclovir und Desciclovir erreicht (Newman und Polk, 1987; Greenspan et al., 1990).

Zum Teil widersprüchliche Resultate wurden bei EBV-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen angegeben. Dies erklärt sich aus der Beteiligung von latenter EBV-Infektion und gleichzeitiger Reaktivierung der Virusreplikation bei deren Entstehung (Sullivan et al., 1982, 1984a, 1984b). Delone et al. (1995) berichteten über die erfolgreiche Behandlung einer EBV-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankung mit Aciclovir und Ganciclovir, während Pirsch et al. (1989) keine Erfolge mit Aciclovir erreichten, Birkeland et al. (1999) aber wiederum den Rückgang einer PTLD unter Aciclovir-Hochdosistherapie beschreiben. Eventuell kann die prophylaktische Gabe von Aciclovir und Ganciclovir das Auftreten einer PTLD verhindern, diese Ergebnisse werden aber in anderen Studien in Frage gestellt (Davis et al., 1995; Kuo et al., 1995). Gruhn et al. (1999) behandelten erfolgreich eine EBV-induzierte Querschnittsmyelitis nach Diagnosesicherung durch EBV-Nachweis mit Ganciclovir und Hyperimmunglobulin. Gleiche Ergebnisse konnten Delleemijn et al. (1995) mit Ganciclovir und Davis et al. (1999) mit Aciclovir und Immunglobulinen bei der Behandlung einer Meningoenzephalitis nach Knochenmarktransplantation erzielen. Oettle et al. (1993) behandelten ebenfalls erfolgreich eine akute EBV-Infektion nach Knochenmarktransplantation.

Hinweise für die Effektivität einer Langzeitbehandlung mit Aciclovir lassen sich aus einer Fall-Kontroll-Kohorten-Studie von Fong et al. (2000) an AIDS-Patienten ableiten. Bei hoher Dosierung von Aciclovir mit 800 mg täglich war die Inzidenz von Lymphomen (Non-Hodgkin) mit 6,9% deutlich geringer als in der unbehandelten Kontrollgruppe (46,6%).

2.5. EBV-Tiermodelle

Tiermodelle sind unverzichtbar für die Erforschung der Ätiologie, Prophylaxe und Therapie von EBV-assoziierten Erkrankungen und der Testung von potentiellen antiviralen Substanzen. Da das Wirtsspektrum des EBV auf den Menschen und einige Neuweltaffen beschränkt ist, besteht ein allgemeiner Mangel an EBV-Tiermodellen (Johannessen und Crawford, 1999).

Der Nachweis eines EBV-verwandten B-lymphotropen Herpesvirus in Schimpansen und EBV-ähnlicher viraler Partikel in Gewebekulturen aus Nierenbiopsien von *Macaca arctoides*-Affen führte zur verstärkten Untersuchung von verschiedenen Affenspezies auf das Vorhandensein von Viren (Landon et al, 1968; Landon und Malan, 1971; Rangan 1974a, 1974b; Rangan et al. 1974, 1977). Deshalb konnten in den 1970er und 1980er Jahren durch Etablierung von Lymphoblastoid-Zelllinien diverse B-lymphotrope Herpesviren sowohl von gesunden als auch von erkrankten Affen mit Lymphomen isoliert werden (Falk et al., 1976a, 1976b; Gerber et al., 1976; Lapin et al., 1985; Rangan et al., 1986).

Aufgrund des Antikörpernachweises gegen Membranbestandteile von EBV in mit HTLV (humanes T-Zell Leukämie Virus) infizierten Makaken vermuteten Homma et al. (1984) ein EBV-ähnliches Virus als ätiologische Ursache für die aufgetretenen lymphoproliferativen Erkrankungen bei diesen Tieren. Die ubiquitäre Verbreitung von Gamma-Herpesviren bei Altweltaffen und speziell in *Macaca fascicularis* und seinen Subspezies ist mehrfach von Ishida et al. dargestellt worden (Ishida et al., 1985; Ishida und Yamamoto, 1987; Ishida und Varavudhi, 1992; Ishida et al., 1993).

Die ersten experimentellen Infektionen mit EBV und EBV-ähnlichen Viren an diversen Spezies von Krallenäffchen (*cotton-top-tamarin* und *common-marmosets*) wurden von Werner et al. (1975), Miller et al. (1972a, 1977) und später Cleary et al. (1985) durchgeführt. Sie zeigten ein breites Ergebnisspektrum von unspezifischen Immunreaktionen bis hin zur Entwicklung maligner Lymphome. Durch die Identifizierung von exprimierten latenten EBV-Proteinen wie EBNA-1, EBNA-2, LMP bei fehlender Expression von EA oder VCA in Gewebebiopsien von Tamarinäffchen konnte erstmals eine Langzeitinfektion im Affen bewiesen werden (Young et al., 1989). Dieses Ergebnis wurde durch direkten Nachweis einer persistierenden EBV-Gen-Expression (EBER-RNA [EBER-1]) im peripheren Blut von infizierten *common-marmosets* bestätigt (Farrell et al., 1997). Aber im Unterschied zum Menschen

kommt es im Latenzstadium der Affen zu keiner charakteristischen Antikörperreaktion gegen EBNA-1. Schon Wedderburn et al. (1984) deklarierten die EBV-Infektion von *cotton-top-tamarin*-Affen als mögliches Modell für die akute humane EBV-Infektion aufgrund der starken Reaktion auf die tumorigenen Eigenschaften des EBV. Problematisch ist, dass es in den Versuchen mit diesen Affen zu sehr unterschiedlichen Reaktionen der Tiere auf die EBV-Infektion kam. Neben voll entwickelten Lymphombildungen zeigten sich auch unspezifische Reaktionen, deren Ursache noch nicht geklärt ist (Niedobitek et al., 1994). Im Gegensatz dazu stand die EBV-Infektion der *common marmosets* als Modell für die persistierende humane EBV-Infektion, da es bei diesen Tieren kaum zu Tumorbildungen kam. In weiteren Untersuchungen gelangen die Etablierung von Lymphoblastoid-Zelllinien von den infizierten Affen sowie die Reinfektion mit diesen und anderen Zelllinien (Zhang et al., 1992, 1993). Außerdem wurde versucht, die unter natürlichen Bedingungen nicht infizierten Altwelt-Rhesusaffen oral mit einem EBV-verwandten Virus (Rhesus Lymphocryptovirus) zu infizieren (Mogdhaddam et al., 1997). Dieses Tiermodell besitzt Schlüsselaspekte der humanen EBV-Infektion wie etwa orale Transmission, Viruspersistenz im Oropharynx, Lymphadenopathie, Aktivierung von CD-23, lytische und latente EBV-Antigenproduktion. Es entspricht deshalb weitgehend der EBV-Infektion im Menschen. Des Weiteren bieten die Tiermodelle die Möglichkeit, EBV-Vakzine zu testen. Zum Beispiel führten Antigene gegen das Membranprotein gp340/220 in diversen Untersuchungen zu viel versprechenden Ergebnissen (Finerty et al., 1992; Morgan et al., 1988; Morgan 1991, 1993; Ragot et al., 1991, 1993). Problematisch ist, dass Affen nur begrenzt für Versuche zur Verfügung stehen.

Deshalb wurde schon früh nach weiteren Tiermodellen gesucht. Mit der Einführung von SCID-Mäusen (severe combined immunodeficient mice) konnten nun xenogene Transplantationen von humanen lymphoiden Zellen zur Untersuchung der Lymphomgenese und der Reaktionen des Immunsystems auf Pathogene vorgenommen werden (Bosma et al., 1983; Moisiere et al., 1988). Bei SCID-Mäusen wurden verschiedenste Tumorerkrankungen wie Leukämien und Lymphome erzeugt (Flavell, 1996). Außerdem konnten durch Transfer von menschlichen EBV-tragenden peripheren Lymphozyten oder durch Injektion von EBV i.v. innerhalb weniger Wochen lymphoproliferative Erkrankungen mit humanem B-Zell-Ursprung in diesen schwer immundefizienten Mäusen hervorgerufen werden (Bashir et al., 1991; Purtilo

et al., 1991; Pisa et al., 1992; Fuzzati-Armentero und Duchosal, 1998; Johannessen und Crawford, 1999). Die Effizienz der Tumorentwicklung und die starke Ähnlichkeit zur frühen Phase der humanen Tumorentstehung in immundefizienten Patienten führten zur weiten Verbreitung und Etablierung des SCID-Modells für diesen und andere Forschungsbereiche (Nakamine et al., 1991; Rowe et al., 1991; Torbett et al., 1991). Durch die Untersuchung von EBV-tragenden lymphoblastoiden Zelllinien konnte eine gute Korrelation zwischen dem Wachstum dieser Zelllinien in vivo und in vitro festgestellt werden (Cuomo et al., 1992). Aber molekularbiologisch wurden große Unterschiede zwischen den SCID-hu-Tumorzellen und den in vitro transformierten lymphoblastoiden Zellen gefunden (Garnier et al., 1993a, 1993b). In weiteren Untersuchungen wurde erkannt, dass bei der Entstehung von Tumoren nach Injektion von peripheren mononukleären Zellen EBV-positiver Spender die Präsenz von T-Zellen entscheidend ist. Außerdem wurde festgestellt, dass die Gabe von Gammaglobulin und EBV-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten innerhalb der ersten vier Wochen nach Versuchsbeginn ein Tumorwachstum verhindern können (Veronese et al., 1992; Abedi et al., 1993, 1996; Buchsbaum et al., 1996). Diese Resultate und weitere Ergebnisse verdeutlichen die zentrale Rolle der T-Zellen in der Kontrolle der latenten EBV-Infektion (Lacerda et al., 1996a, 1996b; Bohlen et al., 1997). Das xenochimäre humane Maus-Modell beschränkt sich auf die alleinige Erforschung exogen induzierter EBV-Lymphome (Dosch et al., 1991) und besitzt aufgrund der mangelnden Immunkompetenz der SCID-Mäuse nur eine eingeschränkte Aussagekraft im Bezug auf die Tumorgenese im immunkompetenten Organismus.

Lapin et al. (1985) identifizierten 1985 das dem EBV ähnliche Virus HVMA (Herpesvirus *Macaca arctoides*), welches aus peripheren Blutlymphozyten der gleichnamigen Affenspezies isoliert wurde. Die Onkogenität des HVMA wurde in der Forschungsgruppe um Lapin in einem Kaninchenmodell beschrieben (Yakovleva et al., 1987; Timanovskaya et al., 1988; Kakubava et al., 1990).

Im Institut für Virologie und Antivirale Therapie der FSU-Jena wurde mit diesem Virus ein reproduzierbares Kaninchen-Tumor-Modell implementiert. Die i.m. Inokulation von konzentriertem Viruspellet oder zellfreiem, virushaltigen Überstand der HVMA-produzierenden Lymphoblastoid-Zelllinie MAL-1 führte in 41% der Fälle innerhalb von sechs Monaten zur Bildung hochmaligner Non-Hodgkin-Lymphome. Die Tumordinfiltrate waren vorwiegend in der Milz, aber auch in Leber und Niere

lokalisiert. Die Tumorgenese war unabhängig von der Rasse der verwendeten Kaninchen (Meerbach, 1991). Die Verwendung von immunkompetenten Lebewesen ist der entscheidende Vorteil des Kaninchenmodells gegenüber dem SCID-Maus-Modell. Vergleichbar mit den beschriebenen Ergebnissen des HVMA-Kaninchenmodells konnten auch japanische Wissenschaftler sowohl durch i.v. Injektion als auch durch orale Inokulation von Virusfraktionen eines EBV-verwandtem Herpesvirus experimentell Lymphome in Kaninchen erzeugen. In diesen Versuchen wurden die Kaninchen i.v. mit HTLV-II-transformierten Leukozyten der Zelllinie Si-IIA oder oral mit zellfreiem Pellet von ts-B6-Zellen, einer Zelllinie, die von *Cynomolgus-Affen* isoliert wurde und ein dem EBV-verwandtes Herpesvirus (cyno-EBV) beherbergt, infiziert. (Hayashi et al., 1994,1995; Chen et al., 1997).

Das HVMA-Kaninchenmodell stellt ein primatenunabhängiges Tiermodell zur Induktion von malignen Lymphomen dar, an dem antivirale Substanzen und EBV-Vakzine getestet werden können sowie die Pathogenese der Tumorentstehung näher erforscht werden kann. Es schließt aufgrund seiner genannten Eigenschaften eine Lücke in den bisherigen Tiermodellen.

3. Ziele der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Fortführung von Experimenten, die im Rahmen des Projektes „Prävention und Therapie EBV-assoziiierter lymphoproliferativer Erkrankungen durch selektive Virostatika und Impfstoffe in einem EBV-like (HVMA) Kaninchenmodell“ innerhalb des VKF (Verbund für klinische Forschung) durchgeführt wurden. Dies beinhaltete die molekularbiologische Untersuchung von Gewebe- und Blutproben der Versuchstiere mit und ohne antivirale Therapie, um den Infektionsverlauf anhand der gewonnenen virologischen Parameter zu beurteilen. Hierzu war der qualitative Nachweis viraler DNA im Plasma, in Leukozyten und in den post mortal entnommenen Gewebeproben vorgesehen.

Die Bestimmung der Anzahl der Virus-Genom-Kopien in den Leukozyten der Tiere sollte dazu beitragen, den zeitlichen Verlauf der Virusinfektion in Bezug auf die Tumorentwicklung zu dokumentieren.

Die virologischen Infektionsparameter, die pathomorphologischen Befunde und der klinische Verlauf der HVMA-Infektion bildeten die Grundlage für die abschließende Bewertung der Tierexperimente.

4. Material und Methoden

4.1. Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial wurde Serum von Patienten mit infektiöser Mononukleose aus der Routinediagnostik des Institutes sowie Plasma, Leukozyten und Gewebeproben der Kaninchen verwendet.

Zur Erstellung einer geeigneten Methodik wurde zuerst Serum von Patienten mit infektiöser Mononukleose mittels qualitativer und quantitativer PCR untersucht. Die Erkrankung wurde klinisch und serologisch diagnostiziert. Die serologische Diagnostik basierte auf der Bestimmung der IgM- und IgG-Antikörper gegen das Viruskapsidantigen (VCA) im Fluoreszenzantikörpertest. Außerdem wurden mittels „enzym-linked immunosorbent-assay“ (ELISA) Antikörper gegen das EBV-Kernantigen EBNA bestimmt. Beweisend für eine EBV-Primärinfektion war die Antikörperkonstellation Anti-VCA-IgG- und Anti-VCA-IgM-positiv, bei gleichzeitiger Abwesenheit von EBNA-Antikörpern.

Im Rahmen des VKF-Projektes wurde in einem Förderzeitraum von 1998 bis 2001 im Institut für Virologie und Antivirale Therapie der Friedrich-Schiller-Universität Jena die Wirksamkeit von Cidofovir im Kaninchenmodell getestet. Die dabei gewonnenen Plasma-, Zell- (Leukozyten) und Gewebeproben bildeten die Grundlage für die durchgeführten Experimente mit anschließender Analyse in der vorliegenden Arbeit. Die Testreihe bestand aus insgesamt 14 Kaninchen. Von diesen wurden sechs Tiere mit HVMA infiziert und mit Cidofovir behandelt. Fünf Tiere wurden mit HVMA infiziert und mit PBS behandelt. Zwei Tiere erhielten nur Cidofovir und ein Kaninchen wurde als Kontrolle nicht behandelt. Die Antigenapplikation erfolgte i.m. in den rechten Hinterlauf der Tiere, Cidofovir und PBS wurden i.v. appliziert (Tab. 2).

Das Antigen wurde aus einer MAL-1 Suspensionskultur mit einer initialen Zelldichte von ca. 2×10^5 Zellen/ml hergestellt, welche für zehn Tage im RPMI-1640 Medium (Rp. 1) kultiviert wurde. Durch Zusatz von nur 5% FKS (fötale Kälberserum; Bio Whittaker, Canbre Company) anstatt 15% (siehe Zellkulturen) zum Kulturmedium verschlechterten sich die trophischen Wachstumsbedingungen für die Zellen, was zu einer in diesem Fall gewünschten vermehrten HVMA-Produktion führte. Die Zellsuspension wurde für 10 min bei 4°C mit 150 x g zentrifugiert, der gewonnene Überstand abgenommen und erneut bei 800 x g für 10 min zentrifugiert. Im

Anschluss erfolgte nun die Ultrazentrifugation des zellfreien Überstandes bei 100.000 x g für eine Stunde bei einer Temperatur von 4°C. Das gebildete Viruspellet wurde in PBS (Rp. 2) resuspendiert und zehnfach konzentriert (auf 1/10 des Volumens reduziert). Die injizierte Dosis entsprach einer Virusmenge, welche spontan von 3 x 10⁷ MAL-1-Zellen innerhalb von zehn Tagen freigesetzt wurde. Die nicht mit dem Virus infizierten Kaninchen 60 und 61 erhielten 5 ml PBS (Rp. 2) i.m. inokuliert.

Tabelle 2: Einteilung der Versuchstiere

Kaninchen-Nr.	HVMA-Viruspelletinjektion	Cidofovir	PBS
59	-	-	-
60	-	+	-
61	-	+	-
62	+	+	-
63	+	+	-
64	+	+	-
65	+	+	-
66	+	+	-
67	+	+	-
68	+	-	+
69	+	-	+
70	+	-	+
71	+	-	+
72	+	-	+

- keine Inokulation
+ Inokulation

Die Cidofovirtherapie wurde 15 min nach der Virusinokulation begonnen und bis zur achten Woche p.i. fortgeführt. Hierfür wurden einmal wöchentlich 5 mg/kg Cidofovir in einem Gesamtvolumen von 2 ml PBS (Rp. 2) gelöst und i.v. in die Ohrvene injiziert. Die Placebo-behandelten Tiere erhielten 2 ml PBS ebenfalls i.v. Alle sieben Tage wurde EDTA-Blut aus der oberen Ohrdrainvene der Kaninchen gewonnen, indem 600-800 µl Kaninchenblut mit 10 µl EDTA (Rp. 3) durch Schwenken gemischt wurden. 100 µl wurden für die DNA-Extraktion nach der DYNAL-Methode verwendet, der Rest bei 7500 rpm und 15°C für 20 min in einer Eppendorffzentrifuge zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und unter gleichen Bedingungen nochmals zentrifugiert. Vom so gewonnenen Plasma wurden 200 µl entnommen und mittels Qiagen-Kit die DNA extrahiert oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Die Tiere wurden ständig hinsichtlich ihres Allgemeinzustandes, Körpertemperatur, Lymphknotenschwellungen, abdominellen Resistenzen und eventueller Tumorbildungen an der Inokulationsstelle untersucht. Vor Versuchsbeginn und einmal pro Woche während der Cidofovirtherapie wurde eine Gewichtsbestimmung zur Konzentrationsberechnung durchgeführt. Bei Tod bzw. nach Abschluss der Versuche wurden die Kaninchen seziiert und makroskopisch sowie histologisch untersucht. Die verschiedenen Gewebe wurden entweder für die Histologie in Formalin fixiert oder bis zur weiteren Untersuchung bei -80°C aufbewahrt.

4.2. Zellkulturen

Als Kontrollen für die PCR wurden verschiedene Zelllinien verwendet, deren Eigenschaften im folgenden Abschnitt beschrieben werden und in Tabelle 3 aufgelistet sind. Die erstmals durch Klein et al. (1972) charakterisierte Zelllinie Namalwa stammt von einem ostafrikanischen Burkitt-Lymphom (Nairobi/Kenia) und enthält zwei in das zelluläre Genom integrierte EBV-Genom-Kopien (Lawrence et al., 1988). Die Zellen sind in der Lage, EBNA zu exprimieren. Die EBV-negative Lymphoblastoid-Zelllinie Ramos wurde aus einem EBV-negativen amerikanischen Burkitt-Tumor angezüchtet (Klein et al., 1975). Die B95-8-Zelllinie stammt von Experimenten, die Miller et al. (1972b) mit EBV-infizierten Affen-Leukozyten durchgeführt haben. Bereits 1 ml dieser Zellpräparation reicht aus, um normale humane B-Lymphozyten zu transformieren. Die Zelllinie B95-8 ist in der Lage, EBNA, EA, VCA, MA und EBER zu exprimieren und besitzt die höchste Anzahl an Virus-

Genom-Kopien pro Zelle (Tumilowicz, 1984; Caputo, 1991). Die MAL-1-Zellen produzieren das B-lymphotrope Herpesvirus *Macaca arctoides* (HVMA). Sie wurden erstmals durch Lapin et al. (1985) aus peripheren Blutlymphozyten der gleichnamigen Affenspezies isoliert. Die Zelllinie produziert EA, VCA, HVMA-NA (Kernantigene) und MA.

Tabelle 3: Charakteristika der Zelllinien

Zelllinie	EBNA	EA	VCA	MA	EBER	Virus-Genom-Kopien pro Zelle
Namalwa	+	–	–	–	–	2
Ramos	–	–	–	–	–	0
B95-8	+	+	+	+	+	> 100
MAL-1	+* (HVMA-NA)	+	+	+	nicht bekannt	nicht bekannt

– keine Expression

+ Expression

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in RPMI 1640-Medium (Rp. 1) als Suspensionskultur bei 36°C und 5% CO₂. Bei der Anzucht von Namalwa-Zellen wurden dem Medium 10%, bei Ramos- und MAL-1-Zellen 15% fötales Kälberserum zugesetzt. Um optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten, mussten die Zellsuspensionen mikroskopisch kontrolliert und die Zellen in einer Dichte von 2 x 10⁵ Zellen/ml alle fünf bis sieben Tage in neues Medium umgesetzt werden.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:10 in PBS (Rp. 2) verdünnt und in die Neubauer-Zählkammer gefüllt. Nach Auszählung von 4 x 16 Kleinquadraten konnte die Zellzahl pro ml berechnet werden, indem die Anzahl der Zellen mit der Gesamtfläche, der Kammertiefe und dem Verdünnungsfaktor multipliziert wurde.

4.3. Untersuchungsmethoden

4.3.1. DNA-Extraktion

DNA wurde zum einen aus Plasma und Kaninchen-Leukozyten und zum anderen aus verschiedenen eingefrorenen Kaninchengeweben extrahiert. Diese Proben stammten aus den im Rahmen des VKF-Forschungsprojektes im Institut für Virologie und Antivirale Therapie durchgeführten Experimenten und waren bei -20°C bzw. -80°C gelagert worden. Außerdem wurde DNA verwendet, die aus dem Serum von Patienten mit klinisch und serologisch gesicherter infektiöser Mononukleose gewonnen wurde.

Zur Extraktion der Plasma- bzw. der Serum-DNA diente ein DNA-Extraktionskit (Qiamp® DNA blood mini kit, Qiagen, Hilden). Dabei wurden 200 μl Plasma mit 20 μl Qiagen-Protease und 200 μl AL-Puffer versetzt, in einem Eppendorfröhrchen 15 sec „gevortext“ und bei 56°C für 10 min inkubiert. Dies führte zur Zellyse mit vollständiger Denaturierung der Proteine und Freisetzung der DNA. Mit 200 μl Ethanol (96-100%) wurde die DNA gefällt und die gesamte Lösung in ein spezielles Filterröhrchen (Qi-Amp spin column) appliziert. Nach Zugabe von Waschpuffern (AW-1/AW-2) nach Vorschrift und Zentrifugation bei 8600 rpm für 1 min sowie 14000 rpm für 3 min erfolgte anschließend die Inkubation mit AE-Puffer bei Raumtemperatur für 5 min. Erst nach erneuter Zentrifugation bei 14000 rpm in einer Eppendorf-Zentrifuge konnte die gereinigte DNA aus dem Filter eluiert, separat aufgefangen und bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt werden.

Die Extraktion der Zell-DNA aus Leukozyten erfolgte mit einem kommerziellen Kit nach der Dynal-Methode (Dynabeads™ DNA DIRECT™ System II; Deutsche Dynal GmbH/Hamburg). Dazu wurden 100 μl EDTA-Blut mit 1 ml Red Cell Lysis Buffer zur Lyse der Erythrozyten 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 14000 rpm in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Dadurch bildeten die Leukozyten ein Pellet am Röhrchenboden und der Überstand konnte dekantiert werden. Durch Zugabe von 200 μl Dynabeads DNA DIRECT™ und erneuter Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur kam es zur Lyse der Leukozyten und Bildung des DNA-Dynabeads-Komplexes. DIRECT™ Dynabeads sind kleine supermagnetische Polymerkugeln, die durch Adsorption an ihrer Oberfläche und Komplexbildung in der Lage sind, die freie DNA zu binden. Durch einen speziellen

Magneten (MPC-Q, magnet-particle-concentrator) wurde ein Magnetfeld erzeugt, welches die an die Perlen gebundene DNA an den Rand des Röhrchens zog, so dass der Überstand verworfen werden konnte. Mit einem speziellen Waschpuffer wurde nach demselben Prinzip das Eluat dreimal gereinigt, um potentielle PCR-Hemmer zu entfernen. Der im Anschluss folgende Arbeitsschritt beinhaltete die Resuspension der DNA in 100 µl Resuspensionspuffer. Nach einer abschließenden Inkubation für 5 min bei 65°C, bei der die Dynabeads magnetisch von der DNA getrennt wurden, konnte die eluierte DNA bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert werden.

Um DNA aus Gewebe zu extrahieren, mussten Gewebestückchen mit einem Gewicht von 25 mg (bei Milz nur 10 mg) abgewogen, zerkleinert, in PBS gewaschen und mit 180 µl Buffer ATL (Qiagen Tissue Kit) gemischt werden. Diese Arbeiten wurden steril in einem gesonderten Labor unter Verwendung von Einmalskalpellen durchgeführt, um jegliche Kontamination der Proben mit fremder DNA zu vermeiden. Nach Zugabe von 20 µl Proteinase K wurden die Proben so lange bei 56°C inkubiert, bis sich das Gewebe vollständig aufgelöst hatte. Zwischenzeitliches „Vortexen“ beschleunigte diesen Vorgang. Danach wurden die Proben mit AL-Puffer bei 70°C für 10 min inkubiert. Die durch die Zelllyse nun freie DNA wurde mit 200 µl Ethanol (96-100%) ausgefällt und wie bei der Plasma-DNA-Extraktion in ein spezielles Filterröhrchen appliziert. Auch hier war es wichtig, potentielle PCR-Hemmstoffe durch gründliches Reinigen mit Waschpuffern (AW1 / AW2) und Zentrifugation bei 8600 und 14000 rpm zu entfernen. Die gereinigte DNA konnte nach 5 min Inkubation mit AE-Puffer bei Raumtemperatur und Zentrifugation bei 14000 rpm aus dem Filter gelöst und ebenfalls bei 4°C aufbewahrt werden.

Zur Gewinnung der DNA aus den Zellkulturen wurde nach zweimaligem Waschen mit PBS (Rp. 2) und Resuspension in 200 µl PBS bei einer maximalen Konzentration von 5×10^6 Zellen die DNA mit Hilfe des Qiamp DNA blood mini kit extrahiert.

4.3.2. Messung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der gewonnenen DNA-Menge wurde durch UV-Spektrometrie bestimmt (Ultrospec plus/UV-visible spectrometers; Pharmacia GmbH, Erlangen). Die zu untersuchende DNA wurde hierzu in Konzentrationen von 1:4 (25 µl DNA/75 µl Aqua dest.) in ein Eppendorfröhrchen pipettiert und gemischt. Nach Eichung des

Photometers durch eine Referenzmessung mit 100 µl Aqua dest. erfolgte die Messung der Proben bei 260 nm und 280 nm in einer Quarzküvette. Zur Berechnung der gesuchten DNA-Konzentration in ng/µl wurde der OD-Wert (optische Dichte) bei 260 nm mit dem Verdünnungsfaktor von vier und dem Faktor 50 multipliziert. Letzterer ergibt sich aus dem Ergebnis der Absorption bei 260 nm, wobei eine OD von 1,0 = 50 µg/ml gemessener DNA entsprachen. Für den Fall, dass der OD-Wert bei 260 nm außerhalb des Messbereiches lag, musste mit höherer Konzentration erneut gemessen werden.

4.3.3. Herstellung der Verdünnungsreihen und Standards

Als Negativkontrolle für die PCR dienten 100 ng/5 µl Ramos-Zell-DNA und als Positivkontrolle wurde je eine 1:10 Verdünnungsreihe von Namalwa-Zell-DNA bzw. MAL-1-DNA in sechs Abstufungen von 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg und 1 pg verwendet. Dadurch konnte die Sensitivität der PCR getestet werden (Abbildung 1). Die Verdünnungsreihe von Namalwa-Zell-DNA sowie 10 ng/5 µl MAL-1-Zell-DNA und 100 ng/5 µl Ramos-Zell-DNA wurden als Standards bei jeder PCR mitgeführt. Als Untersuchungsproben diente die extrahierte DNA aus Plasma, Serum, Leukozyten und Gewebe. Sie wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: bei Plasma 5 µl konzentrierte DNA-Lösung, bei Leukozyten maximal 1 µg und beim Gewebe kamen ca. 100 ng zum Einsatz. Höhere DNA-Konzentrationen wurden nicht verwendet, da größere Mengen als 1 µg DNA den Ablauf der PCR hemmen können (Maniatis, 1989).

4.3.4. PCR

Die PCR ist eine thermozyklische Reaktion, wobei in jedem Zyklus die zu Zyklusbeginn bereitgestellte DNA-Menge verdoppelt wird. Um Kontaminationen zu vermeiden, erfolgte die Vorbereitung der Amplifikationsmischung in einem gesonderten DNA-freien, nur zu diesem Zweck bestimmten Laborraum.

Der Reaktionsmix bestand aus speziellem PCR-Puffer (Rp. 4), 200 µM dNTP (PCR Nucleotid Mix; Roche), 1 µM von jedem Primer, 1,2 U Taq-Polymerase (Roche Diagnostics GmbH Mannheim) und 5 µl Proben-DNA / 50 µl. Bei der Verwendung der Primer pol-1 und pol-2 wurden dem Mix 10% Glycerin (Sigma, USA) zugesetzt. Dies

erhöhte die thermale Stabilität der Polymerase und verringerte die notwendige Temperatur für die Strangseparation (Cheng und Mitchelson, 1994). Die Zugabe der zu amplifizierenden Proben-DNA und der automatische Reaktionsablauf der PCR in speziellen Thermozyklern (T3-Thermozykler, Biometra, Göttingen) erfolgten in gesonderten Laborräumen, um Kontaminationen zu vermeiden. Nach einem initialen fünfminütigem Denaturierungsschritt bei 94°C folgten 30 PCR-Zyklen, die aus nacheinander folgenden, sich wiederholenden Einzelschritten bestanden. Im ersten Zyklus wurde die doppelsträngige DNA (dsDNA) 45 sec bei 94°C denaturiert, wodurch Einzelstrang-DNA (ssDNA) entstand. Danach wurde der Ansatz auf 60°C heruntergekühlt. Bei dieser Temperatur erfolgte für 45 sec das sogenannte „annealing“, bei dem sich die Primer an spezifische komplementäre Sequenzabschnitte im 5' Bereich der separierten Nukleinsäurestränge, ca. 20-30 bp (Basenpaare) links und rechts des zu amplifizierenden Abschnitts, anlagerten. Dadurch wurde verhindert, dass sich die einzelsträngige DNA wieder selbst zusammenlagert. Im Anschluss konnte die DNA-Polymerase nun die einzelsträngige-DNA zur doppelsträngigen-DNA ergänzen. Hierbei knüpft sie die im Reaktionsansatz enthaltenen Nukleotide ausgehend von den Primern komplementär an die freie OH-Gruppe des Zuckers im Nukleotid an. Dieser Schritt wird Kettenverlängerung oder Extension genannt, er dauerte 1,5 min und fand bei 72°C statt, dem Temperaturoptimum der verwendeten Polymerase. Nach einem abschließenden Inkubationsschritt für 7 min bei 72°C war die erste PCR beendet, und die Proben wurden auf 4°C abgekühlt. Im Anschluss an die erste PCR folgte die sogenannte „nested“ PCR, wobei 1 µl Amplifikat-Lösung der ersten PCR zu 49 µl Mix mit „inneren Primern“ gegeben und erneut in 30 Zyklen vervielfältigt wurden. Diese Primer grenzten den gesuchten DNA-Abschnitt weiter ein. Dadurch erreichte die „nested“-PCR eine um ein Vielfaches erhöhte Quantität und Sensitivität.

Als Primer für den EBV-HVMA-Nachweis fanden die Oligonukleotide pol-1 und pol-2 Verwendung, die ein 522 bp großes Fragment der HVMA-DNA-Polymerase-Region amplifizieren. Für die „nested“-PCR wurden pol-3 und pol-4 verwendet. Sie amplifizieren ein 405 bp großes Segment ebenfalls aus der Polymeraseregion und liegen im BALF5-Abschnitt des EBV-Genoms. Zum Nachweis der EBV-DNA im Serum der Patienten mit klinisch und serologisch gesicherter infektiöser Mononukleose wurden Primer aus der VCA-p23 Region eines viralen Kapsidantigens im BLRF2-Segment (p23-1 und p23-2 sowie für die „nested“-PCR die Primer p23-3

und p23-4) eingesetzt. Sie amplifizieren ein 482 bp bzw. ein 363 bp großes Fragment des VCA-Gens.

Insgesamt wurden 49 Serum-Proben von Patienten mit infektiöser Mononukleose mittels PCR bearbeitet. Außerdem wurden 293 DNA-Proben aus dem Plasma der Kaninchen qualitativ und 293 DNA-Proben aus den Leukozyten der Versuchstiere mit Hilfe der PCR qualitativ und quantitativ untersucht.

Tabelle 4: Eigenschaften der verwendeten PCR-Primer

Primer	Sequenz	Fragment	Position
pol - 1	5' - GTCCGTGTCCCCGTAGATG - 3'	522 bp	154.476 -154.494
pol - 2	5' - GACTTTGCCAGCCTCTACC - 3'		154.997 -154.979
pol - 3	5' - GGCTCAGGGCCTCCAAG - 3'	405 bp	154.568 -154.587
pol - 4	5' - TCATTCAGGCTATATAATCTC - 3'		154.972 -154.953
p23 - 1	5' - ATCAGAAATTTGCACTTTCTTTGC - 3'	482 bp	89.410 - 89.387
p23 - 2	5' - CAGCTCCACGCAAAGTCAGATTG - 3'		88.929 - 88.951
p23 - 3	5' - TTGACATGAGCATGGAAGAC - 3'	363 bp	88.968 - 88.987
p23 - 4	5' - CTCGTGGTCGTGTTCCCTCAC - 3'		89.330 - 89.310

bp = Basenpaare

Gel-Elektrophorese

Die Gel-Elektrophorese ist eine etablierte Standardmethode zur Auftrennung von Proteinen oder Nukleinsäuren. Die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel korreliert eng mit der Molekülgröße, so dass diese Methode zur Molekulargewichtsbestimmung eingesetzt werden kann. Die Darstellung der durch die PCR gewonnenen DNA-Amplifikate erfolgte mit der Agarose-Gel-Elektrophorese, wobei 0,8% Agarose (Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe) in 0,5 x TBE Pufferlösung (Rp. 5) erhitzt wurde, bis die Agarose vollständig gelöst war. Bei nicht sofortiger Verwendung wurden die Gelportionen im Kühlschrank bei 4°C gelagert und erst kurz vor ihrer Verwendung durch erneutes Erwärmen wieder verflüssigt. Nach Abkühlung auf ca. 50°C erfolgte die Zugabe von 4 µl Ethidiumbromid-Stammlösung in einer Konzentration von 1

mg/ml als Farbindikator zur DNA-Markierung. Ethidiumbromid lagert sich zwischen den Basen der DNA an und emittiert eine fluoreszierende Strahlung nach UV-Belichtung. Die Endkonzentration im Gel lag bei 0,04 µg/ml. Beim Einfüllen des Gels in den Gelgießstand (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco) musste darauf geachtet werden, dass eine ca. 5-8 mm hohe plane und blasenfreie Schicht entsteht, um eine gleichmäßige Wanderung der Proben ohne unterschiedliche Widerstände zu gewährleisten. In das noch flüssige Gel wurden mit Hilfe von sogenannten Kämmen 20 ca. 4 mm tiefe Einkerbungen gedrückt, in die später die zu trennenden DNA-Proben pipettiert wurden. Nach ca. 45 min waagerechter Lagerung des mit Kämmen bestückten Gels im Kühlschrank war es vollständig auspolymerisiert. Die Kämmen konnten vorsichtig entfernt und das Gel zusammen mit 0,5 x TBE Pufferlösung (Rp. 5), die das Gel vollständig bedecken mussten, in die Gel-Elektrophoresekammer gegeben werden. Nach jedem Einsatz erfolgte eine gründliche Reinigung der Kammer und des Gelträgers mit Aqua dest., um eventuelle Agaroserückstände sicher zu entfernen. In der Elektrophorese wurden 10 µl PCR- Amplifikat mit 2 µl Ladepuffer (Rp. 6) gemischt und bei 95 V für ca. 1,5 Stunden aufgetrennt. In jedes Gel wurde ein bestimmter Molekulargewichtsmarker (Abb. 1) in einer Konzentration von 250 ng/10 µl zur Größenbestimmung mitgeführt.

Auswertung

Die positiven Amplifikate konnten bei UV-Licht mittels DNA-Transilluminator, Crosslinker (Biometra, Göttingen) identifiziert und zur Archivierung fotografiert (Polaroid MP4⁺, Polaroid, USA) werden. Die Intensität der UV-Strahlung wird mit ca. 9,4 mW/cm² beziffert. Zur genaueren Differenzierung und Erhöhung der Sensitivität wurde im Anschluss an die erste PCR entweder eine Southern-Blot-Hybridisierung oder eine „nested“-PCR durchgeführt.

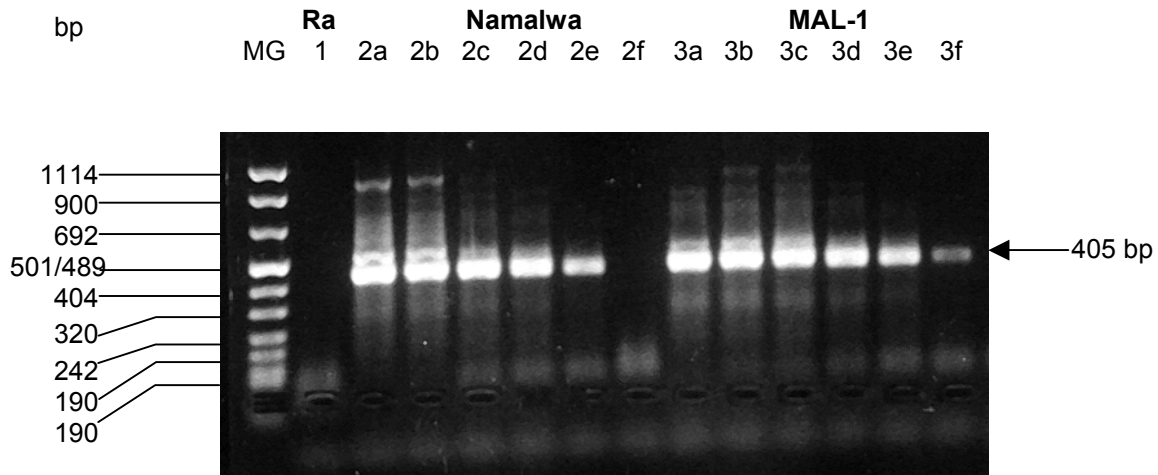


Abb. 1: Gel-Elektrophorese der EBV/HVMA nested-PCR Amplifikate der Standardpräparationen

MG = Molekulargewichtsmarker Nr. VIII

1 = Ramos-Zell-DNA 100 ng

2a-f = Namalwa-Zell-DNA 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg

3a-f = MAL-1-Zell-DNA 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100ng, 10 pg, 1pg

4.3.5. Berechnung der HVMA-Genom-Kopien

Durch Messung im Spektrometer konnte die Zell-DNA-Konzentration in 5 μ l Lösung berechnet werden. Im unten angegebenen Beispiel betrug sie 58 ng/5 μ l. Die gemessene DNA wurde in einer Verdünnungsreihe mit dem Faktor 4 in die PCR und die „nested“-PCR eingesetzt. In der sich anschließenden Elektrophorese wurde die letzte noch sichtbare Bande bestimmt. Diese entsprach ca. zehn Virus-Genom-Kopien und stellte die Empfindlichkeitsgrenze der PCR dar. Sie lag im verwendeten Beispiel bei einer Verdünnung von 1:256. Durch Division von 58 ng durch 256 erhielt man 226 pg. Das bedeutet, dass in der eingesetzten DNA-Konzentration von 226 pg noch ca. zehn Virus-Genom-Kopien nachweisbar sind. Da in der Ausgangsmenge von 10^5 Zellen rund 1 μ g DNA enthalten war, wurde die errechnete Anzahl der HVMA-Genom-Kopien auf die Gesamtmenge bezogen, indem 1 μ g DNA durch 226 pg dividiert und mit dem Faktor 10, der Empfindlichkeit der PCR, multipliziert wurde. Das Ergebnis ging nach Abrundung in die Auswertung ein und entsprach der Anzahl der Virus-Genom-Kopien in 10^5 Zellen. Im folgenden Beispiel ist die Berechnung der Virus-Genom-Kopien vereinfacht dargestellt.

<u>Beispiel:</u>	- DNA-Konzentration:	- 58 ng/5 μ l
	- letzte sichtbare Bande:	- 1 : 256
		$\Rightarrow 58 \text{ ng} / 256 = 226 \text{ pg}$
	- $\frac{10 \text{ Kopien}}{226 \text{ pg}}$	= $\frac{\text{X Kopien}}{1.000.000 \text{ pg}}$
	- X Kopien	= $\frac{1.000.000 \text{ pg} \times 10 \text{ Kopien}}{226 \text{ pg}}$
	- X Kopien	$\cong 40.000 \text{ Kopien} / 10^5 \text{ Zellen}$

Um die Anzahl der EBV-Genom-Kopien pro ml Patientenserum zu berechnen, wurde der Verdünnungsfaktor mit 500 multipliziert.

4.3.6. Sondenpräparation

Die für die Southern-Blot-Hybridisierung benötigte Digoxigenin-markierte pol-Sonde wurde in Anlehnung an die Methode von Emanuel (1991) mittels PCR hergestellt. Dies ist eine effiziente und einfache Methode zur Synthese von Hybridisierungssonden ohne Verwendung radioaktiver Marker. Hierbei wird die Sonden-DNA durch PCR vervielfältigt, danach im Agarosegel aufgetrennt, durch ein kommerzielles Gelextraktionskit (QIAquick Gel Extraction Kit; Qiagen) extrahiert und gereinigt. Der PCR-Mix für die Sondenpräparation beinhaltet 1 x PCR Puffer (Rp. 4), 2,5 U Taq-Polymerase, 1 μ M pol-3 und 1 μ M pol-4 als Primer, 500 ng/50 μ l EBV-B95-8-DNA sowie 200 μ M dNTP (PCR-DIG-Labeling-Mix (Roche, Mannheim). Letzteres ist eine Mischung der Nukleotide von dATP, dCTP, dGTP, dTTP und Digoxigenin-11-dUTP. Das Digoxigenin-markierte Nukleotid wurde unter den in Abschnitt 4.3.4. beschriebenen PCR-Bedingungen direkt in das PCR-Produkt eingebaut.

Nach Beendigung der pol-PCR wurden die Amplifikate in einem 0,8 % Agarosegel aufgetrennt, die einzelnen Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und gewogen. Eine Agarosesäule (200 mg) wurde mit 600 μ l Puffer QG vermischt und bei 50 °C für 10 min inkubiert. Zwischenzeitliches „Vortexen“ beschleunigte die vollständige Lösung des Gels. Durch Zugabe von 200 μ l Isopropanol zur gelösten Flüssigkeit und Zentrifugation im speziellen QIAamp spin column wurde die DNA gefällt und mittels

PE-Puffer und erneuter Zentrifugation gereinigt. Nach 1 min Inkubationszeit mit EB-Puffer konnte die DNA bei 14000 rpm eluiert werden. Zur Überprüfung der Sondenkonzentration wurden 1 μ l, 3 μ l und 5 μ l Sonden-DNA in ein zweiprozentiges Agarosegel gegeben und mit einem Molekulargewichtsstandard verglichen. Die hergestellten Sonden wurden bei -20°C gelagert.

Für die Southern-Blot-Hybridisierungen wurden 100 ng der pol-Sonde in 3-4 ml Hybridisierungslösung (Rp. 7) gegeben. Da das gesamte HVMA-Genom noch nicht sequenziert ist, existieren keine spezifischen HVMA-Polymerase-Sonden. Da aber im sequenzierten Polymerasebereich beide Genome zu rund 95% übereinstimmen (Wutzler et al., 1995), gilt die Verwendung einer EBV-spezifischen pol-Sonde als sehr zuverlässig.

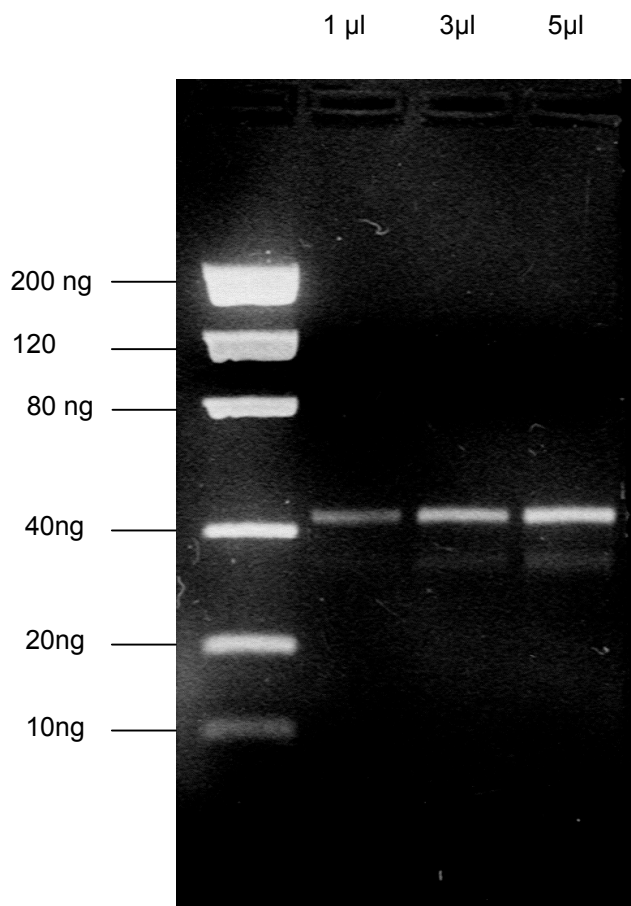


Abb. 2: Überprüfung der Sondenkonzentration im Gel durch Vergleich mit einem Molekulargewichtsstandard

- „Low DNA mass ladder“ (Invitrogen GmbH / Karlsruhe) ist aus 6 Fragmenten von 100 bp bis 2000 bp bzw. von 10 bis 200 ng zusammengesetzt
- eingesetzte Probenmenge: - 1 μ l, 3 μ l und 5 μ l DNA
- ermittelte Sondenkonzentration: - 1 μ l ~ 10 ng Sonden-DNA

4.3.7. Southern-Blot-Hybridisierung

Insgesamt wurden 97 Gewebeproben untersucht, wobei teilweise auch zwei Proben aus verschiedenen Regionen des gleichen Organs von einem Kaninchen getestet wurden. Am häufigsten wurden die Nieren (25 Proben), das Herz und die Leber (je 15 Proben), die Lunge (14 Proben) sowie die Milz (12 Proben) untersucht. Außerdem wurden bei einigen Kaninchen noch Gewebeproben von Tumorinfiltraten der Haut, dem Fettgewebe und den Muskelfaszien verwendet (insgesamt 16 Proben).

Zum Nachweis der viralen PCR-Amplifikate im Kaninchengewebe wurde im Anschluss an die erste PCR mit Gel-Elektrophorese die Southern-Blot-Hybridisierung durchgeführt. Hierzu wurde die im Gel befindliche DNA für je 20 min erst mit Denaturierungslösung (Rp. 8) und danach mit Neutralisationslösung (Rp. 9) behandelt und durch einen Saugvakuum-Blotter (Biometra, Göttingen) auf eine Nylonfiltermembran (Boehringer, Mannheim) übertragen. Der Saugvakuum-Blotter besteht aus zwei Plastikblöcken, die durch Klammern zusammengehalten werden, wobei das Gel mit den zu trennenden Proben in den oberen Block eingelegt wird. Darunter befindet sich die Nylonmembran, auf welche die DNA übertragen wird. Am unteren Block wird die Vakuumpumpe angeschlossen und die verbrauchte Transferlösung aufgefangen (Abb. 3). Der Blotvorgang dauerte etwa eine Stunde, und die Membran musste mit 5 x SSC (Transferpuffer Rp. 10) überschichtet bleiben. Um ein präzises Blotergebnis zu erzielen und gleichzeitig eine Diffusion in die Umgebung zu verhindern, wurde zwischen Membran und Blotapparatur vierfach ein Gel-Blotting-Papier (Schleicher und Schuell GmbH, Dassel) gelegt. Durch zehnmündige UV-Bestrahlung bei 300 nm (Transilluminator UCTM 25, Hoefer Scientific Instruments, USA) kommt es zum „crosslinking“, d.h. die DNA vernetzt sich mit der Trägermembran. Danach wurde die Membran für 1-2 Stunden bei 42°C prähybridisiert (Rp. 7). Dies verhindert eine zu starke Hintergrundfärbung durch Blockierung unspezifischer Bindungen. Die eigentliche Hybridisierung fand ebenfalls bei 42°C für 12-18 Stunden statt (Hybridisierungsofen: - MINI 10, MWG Biotech mbH). Zur Detektion wurde die pol-Sonde in einer Konzentration von 100 ng pro 3 ml Hybridisierungslösung (Rp. 7) verwendet. Die sich anschließenden Waschschrirte der Membran mit 2 x SSC/0,1% SDS (Rp. 11) für 10 min bei Raumtemperatur und 2 x 15 min mit 0,1 x SSC/0,1% SDS (Rp. 11) bei 65°C, mussten mit großer Gründlichkeit durchgeführt werden, um nicht gebundene Sondenanteile zu entfernen. Da

unspezifische Reaktionen verhindert werden sollten, wurde die Membran für 2 x 15 min ebenfalls bei Raumtemperatur mit Blockierungspuffer (Rp. 12) inkubiert. Anschließend wurde die Membran für 30 min in Konjugat-Lösung (Rp. 13) mit Anti-Dig-AP bei einer Verdünnung von 1:5000 inkubiert und danach mit Waschpuffer (Rp. 14) gereinigt und zur Äquilibration eines pH-Wertes von 10,0 für 5 min in Assaypuffer (Rp. 15) gelegt. Der Nachweis der Hybridisierungssignale erfolgte durch Chemilumineszenzdetektion mit einem Substrat für die alkalische Phosphatase (CSPD; Roche Mannheim), welches dem schnellen und sensitiven Nachweis von Biomolekülen durch Erzeugung von sichtbarem Licht dient. Die enzymatische Dephosphorylierung von CSPD führt zur Bildung eines freien metastabilen Dioxetan-Phenolat-Anions, welches zerfällt und in gepufferter Lösung Strahlung bei 477 nm emittiert (Bronstein et al., 1991). In einer Verdünnung von 1:500 wurde CSPD in 20 ml Assaypuffer (Rp. 16) gelöst und darin die Membran für 5 min im Dunkeln inkubiert. Nach der Behandlung mit CSPD musste diese in Klarsichtfolie gelegt werden. Die Inkubation des auf die Membran gelegten Films (Kodak X-Omat LS; Sigma, Steinheim) dauerte zwischen 15 und 20 min und erfolgte in einer lichtundurchlässigen Fotobox (Kodak, USA). Für die Entwicklung wurde der Film 3 min in Entwicklerlösung gebadet (Kodak GBX Entwickler; Kodak, USA), danach im Wasserbad gespült, für 3 min in eine Fixierlösung (Kodak GBX Fixierer; Kodak, USA) getaucht und abschließend mit Leitungswasser gespült.

Die Auswertung erfolgte für jeden Film individuell: 0 bedeutete keine Färbung erkennbar, 1+ eine schwache, 2++ eine gute und 3+++ eine starke Schwärzung des Films. Die Intensität der Schwarzfärbung der Signale korrelierte mit dem Größenwert für die optische Dichte.

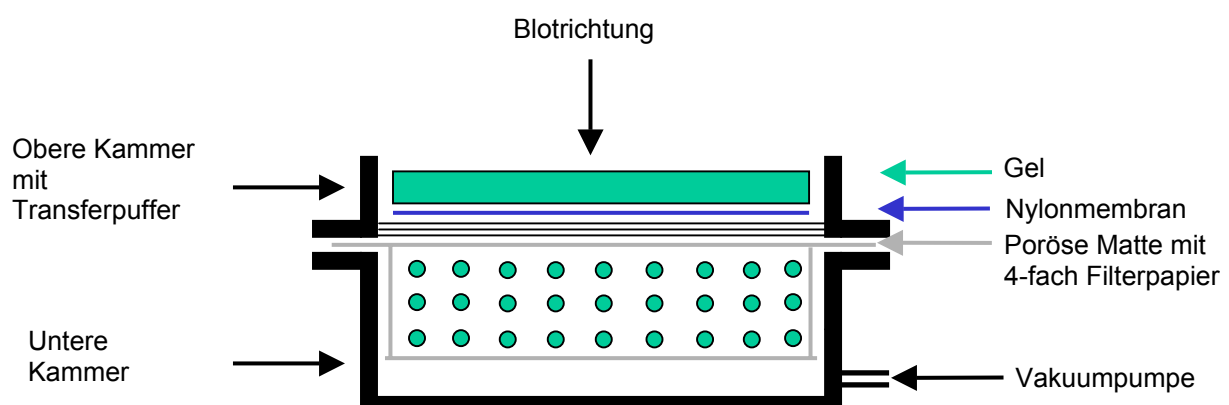


Abb. 3: Aufbau des Saugvakuum-Blotters

4.4. Rezepturen und Reagenzien

Rp. 1**RPMI 1640 Medium (Biochrom AG, Berlin)**

Medium plus:

- L-Glutamin (200 mM) 1% (5 ml/500 ml)
- Penicillin (50 000 U) / Streptomycin (50 000 µg/500 ml)

Rp. 2

PBS = Phosphate buffered Saline (PBS) = Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung

Zusammensetzung	Gesamtmenge: 1 l
2,7 mM KCl	0,2 g
137 mM NaCl	8,0 g
1,5 mM KH ₂ PO ₄	0,24 g
7,75 mM Na ₂ HPO ₄	1,44 g

Rp. 3

0,5 M EDTA, pH 8,0

Zusammensetzung	Gesamtmenge: 100 ml
Dinatriummethyldiamintetraacetat + 2 x H ₂ O (EDTA)	18,61 g
NaOH – Pellets	2 g

- pH 8,0; ad 100 ml Aqua dest.

Rp. 4**PCR-Puffer (Roche, Mannheim)**

Zusammensetzung
50 mM KCl
1,5 mM MgCl ₂
10 mM Tris HCl pH 8,3
0,01 % Gelatine

Rp. 5**5 x TBE**

Zusammensetzung	Gesamtmenge: 1 l
0,045 M Tris	54 g
0,045 M Borsäure	27,5 g
0,001 M EDTA	20 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0

- pH 8,3; ad 1 l Aqua dest.

Rp. 6**6 x Ladepuffer**

Zusammensetzung	Gesamtmenge: 10 ml
0,25% Bromphenolblau	0,025 g
0,25% Xylen Cyanol FF	0,025 g
40% Saccharose	4 g

- 0,5 x TBE-Puffer ad 10 ml

Rp. 7**Hybridisierungslösung**

Zusammensetzung	Gesamtmenge: 250 ml
5 x SSC	62,5 ml (von 20 x SSC)
5% Blocking-Reagenz	12,5 g
0,1% N-Lauryl-Sarcosin	2,5 ml (von 10% Stammlösung)
0,02% SDS	0,25 ml (von 20% Stammlösung)
50% Formamid (deionisiert)	125 ml

- Aqua dest. ad 250 ml

Rp. 8**Denaturierungspuffer**

Zusammensetzung	Gesamtmenge: 1 l
1,5 M NaCl	88 g
0,5 M NaOH	20 g

- ad 1 l Aqua dest.

Rp. 9**Neutralisationspuffer**

Zusammensetzung	Gesamtmenge: 1 l
0,5 M Tris-HCl, pH 7,5 (Rp. 19)	500 ml 1 M
3 M NaCl	175,2 g

- ad 1 l Aqua dest.

Rp. 10**20 x SSC**

Zusammensetzung	Gesamtmenge: 1 l
3 M NaCl	175,3 g
0,3 M Trinatriumcitrat $C_6H_5Na_3O_7 + 2 \times H_2O$ (bei RT)	88,2 g

- ad 1 l Aqua dest., autoklavieren

Rp. 11**Waschlösungen nach der Hybridisierung**

I.

Zusammensetzung	Gesamtmenge: 1 l
2 x SSC	100 ml
0,1% SDS	5 ml

- ad 1 l Aqua dest.

II.

Zusammensetzung	Gesamtmenge: 1 l
0,1 x SSC	5 ml
0,1% SDS	5 ml

- ad 1 l Aqua dest.

Rp. 12**Blockierungspuffer**

Zusammensetzung	Gesamtmenge: 250 ml
1 x Konjugatpuffer	249,75 ml
0,1% Tween 20	0,25 ml

- Lagerung bei 4 °C

Rp. 13**Konjugatpuffer**

Zusammensetzung	Gesamtmenge: 300 ml
0,2% I-Block Reagenz	0,6 g
1 x PBS (Rp. 17)	30 ml 10 x PBS (Rp. 17)

- 30 ml 10 x PBS + 200 ml Aqua dest. + I-Block-Reagenz
- ⇒ ca. 80 sec in der Mikrowelle erhitzen
- mittels Magnetrührer mischen und Aqua dest. bis 300 ml auffüllen
- Lagerung bei 4 °C

Rp. 14**Waschpuffer**

Zusammensetzung	Gesamtmenge: 500 ml
1 x PBS	50 ml 10 x PBS (Rp. 17)
0,3% Tween 20	1,5 ml

- ad 500 ml Aqua dest.

Rp. 15**Assaypuffer**

Zusammensetzung	Gesamtmenge: 250 ml
0,1 M Diethanolamin (DEA)	2,6 g
1 mM MgCl ₂ (Rp. 20)	0,05 g

- DEA in 200 ml Aqua dest. lösen und mit HCl auf einen pH von 10,0 einstellen
- MgCl₂ zugeben und mit Aqua dest. auf 250 ml auffüllen

Rp. 16**Chemilumineszenz-Substrat-Lösung**

Zusammensetzung	Gesamtmenge: 5,0 ml
0,25 mM CSPD-Substrat	10 µl CSPD
Assay Puffer (Rp. 12)	5 ml

Rp. 17**10 x PBS = Phosphate buffered Saline (PBS) = Phosphat gepufferte Kochsalzlösung**

Zusammensetzung	Gesamtmenge: 1 l
0,58 M Na ₂ HPO ₄	82,3 g
0,17 M NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	23,5 g
0,68 M NaCl	40,0 g

- ad 1 l Aqua dest., autoklavieren
- pH 7,2-7,5

Rp. 18**20% SDS**

Zusammensetzung	Gesamtmenge: 100 ml
SDS	20 g

- ad 100 ml Aqua dest. auffüllen

Rp. 19**1 M Tris-HCl; pH 7,5**

Zusammensetzung	Gesamtmenge: 1 l
1 M Tris-Base	121,1 g
HCl	65 ml

- pH 7,5; ad 1 l Aqua dest.

Rp. 20**1 M MgCl₂**

Zusammensetzung	Gesamtmenge: 100 ml
1 M MgCl ₂	20,33 g

- ad 100 ml Aqua dest.

5. ERGEBNISSE

5.1. Patienten mit infektiöser Mononukleose

Zur Etablierung der Methode der qualitativen und quantitativen PCR wurde Serum von 49 Patienten mit infektiöser Mononukleose verwendet. Von den im Durchschnitt 18 Jahre alten Patienten wurde am Tag der klinischen Diagnosestellung Blut abgenommen und Serum gewonnen, welches bei -20°C aufbewahrt wurde. Aus diesem wurde später die DNA extrahiert und in einer qualitativen EBV-PCR und nested-PCR mit den Primern p23-1, p23-2 und p23-3, p23-4 untersucht. Bei allen positiv getesteten Proben wurde im Anschluss durch eine quantitative PCR die Anzahl der EBV-Genom-Kopien pro ml Serum bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 5 aufgelistet. Wie aus dieser Tabelle hervorgeht, war die EBV-PCR im Serum zum Untersuchungszeitpunkt bei 27 Patienten positiv und bei 22 Patienten negativ. In der quantitativen PCR, die nur bei den qualitativ positiv getesteten Proben durchgeführt wurde, konnten positive Ergebnisse bis zu einer Verdünnung von 1:16 gefunden werden. Die errechneten EBV-Genom-Kopien lagen zwischen 500 und 8000, im Durchschnitt bei ca. 3700/ml. Bei acht Patienten konnten bis zu 1000, bei elf Patienten zwischen 2000 und 4000 und bei weiteren acht Patienten eine Anzahl von 8000 Virus-Genom-Kopien pro ml Serum nachgewiesen werden.

5.2. Tierexperimente

5.2.1. Klinischer Verlauf, makroskopische und mikroskopische Befunde

Von den insgesamt verwendeten 14 Kaninchen wurden drei Tiere nicht, die anderen elf Tiere mit HVMA-Viruspellet infiziert und anschließend entweder mit PBS oder mit Cidofovir behandelt. Die Einteilung der Versuchstiere sowie die makroskopischen Veränderungen und histologischen Befunde sind in Tabelle 6 dargestellt. Über den gesamten Versuchszeitraum wurde der Allgemeinstatus der Tiere erhoben und klinische Auffälligkeiten dokumentiert. Von den elf infizierten Kaninchen erkrankten acht (73%). Sie fielen durch verminderte Nahrungsaufnahme mit Gewichtsverlust und reduzierter Ausscheidung und gastrointestinalen Symptomen wie Diarrhoe auf (Kaninchen-Nr.: 63, 64, 65, 66, 67, 68, 70, 71). Außerdem trat bei vier Tieren eine schwere Konjunktivitis und Keratitis auf (Kaninchen-Nr.: 63, 66, 67, 68). Die nicht infizierten Tiere zeigten keine Symptomatik und überlebten den Versuchszeitraum von 24 Wochen, während von den infizierten Tieren sieben vor Versuchsende zwischen der 8. und der 23. Woche verstarben. Im Durchschnitt trat der Tod bei diesen Kaninchen in der 19. Woche ein. In der anschließenden Sektion mit makro- und mikroskopischer Beurteilung konnte bei neun Tieren (82%) ein malignes Lymphom festgestellt werden. Bei allen neun Tieren wurden makroskopisch sichtbare Veränderungen wie Splenomegalie, fleckige Zeichnung der Leber, stechnadelkopf-, linsen- oder erbsgroße helle Herde in Milz und Nieren festgestellt. Außerdem fanden sich gehäuft knotige Herde in Darm und Fettgewebe. Zwei der drei klinisch unauffälligen Kaninchen (Kaninchen 69 und 72) waren histologisch ebenfalls ohne pathologischen Befund. Nur bei dem nicht erkrankten Kaninchen 62 konnte in den makroskopisch veränderten Organen ein maligner Tumor gefunden werden. Nachfolgend werden der klinische Verlauf sowie die makroskopischen und histologischen Befunde im Detail beschrieben.

Kaninchen 59: *keine Virusinfektion, keine Behandlung*

Im gesamten Versuchsverlauf war das Tier klinisch unauffällig, mikro- und makroskopisch waren keine Organveränderungen feststellbar.

Kaninchen 60, 61: *keine Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

Bei den nicht mit dem Virus infizierten Kaninchen konnten sowohl klinisch als auch in der Histologie keine Krankheitszeichen gefunden werden.

Kaninchen 62: *Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

Klinisch war dieses Tier bis zum Versuchsende unauffällig, aber schon in der makroskopischen Untersuchung zeigten sich in der Milz ein ca. erbsgroßer knotiger Herd und in beiden Nieren multiple weißliche grieskorngroße Infiltrate. Die Histologie ergab ein hochmalignes Non-Hodgkin-Lymphom.

Kaninchen 63: *Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

Dieses Kaninchen hatte relativ früh einen deutlich reduzierten Allgemeinzustand mit Keratitis und Keratokonjunktivitis und verstarb in der zwölften Woche. Makroskopisch fielen eine geringfügig vergrößerte Milz und multiple stecknadel- bis linsengroße weißliche Infiltrate in der Leber und den Nieren auf. Außerdem wurden an der Bauchseite subkutan und in den Bauchmuskeln und deren Faszien mehrere derbe Herde bis maximal Walnussgröße entdeckt. Histologisch wurden die Infiltrate als malignes Lymphom klassifiziert.

Kaninchen 64: *Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

Auffällig bei diesem Tier war ein frühzeitig verminderter Allgemeinzustand, es verstarb in der elften Woche p.i. Die makroskopische Beurteilung ergab eine vergrößerte Milz mit stecknadelkopfgroßen weißlichen Infiltraten und Absiedlungen in Leber, Darm und Fettgewebe, die histologisch als malignes Lymphom beschrieben wurden.

Kaninchen 65: *Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

Nachdem sich sein Allgemeinzustand auf Grund von Diarrhoe und schlechter Nahrungsaufnahme zunehmend verschlechterte, verstarb dieses Tier in der 19. Woche. Makroskopisch fanden sich stecknadelkopfgroße helle Herde in Milz, Leber und Nieren. Auch hier ergab die Histologie ein malignes Lymphom.

Kaninchen 66: *Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

Schon in den ersten Wochen des Versuches war das Kaninchen durch stark verminderte Nahrungsaufnahme und Ausscheidung mit daraus resultierendem Gewichtsverlust aufgefallen. Nach kurzzeitiger Besserung trat an beiden Augen eine Konjunktivitis und Keratokonjunktivitis auf. Der Allgemeinzustand verschlechterte sich rapide und das Tier verstarb in der 18. Woche p.i. In der makroskopischen Untersuchung zeigte sich eine Splenomegalie mit kirschgroßem zentral liegendem Tumor sowie eine ebenfalls vergrößerte linke Niere mit hellen derben Infiltraten. Des Weiteren fanden sich in der Bauchhaut und den Bauchmuskelfaszien ein ca. bohnen großer Herd und knotige Infiltrate im abdominalen und inguinalen Fettgewebe sowie im Kieferbereich. Histologisch wurden alle Infiltrate als malignes Lymphom diagnostiziert.

Kaninchen 67: *Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

Sein bis dato relativ guter Allgemeinzustand nahm ab der 18. Woche bis zum Versuchsende in der 24. Woche rapide ab, Nahrungsaufnahme und Ausscheidung waren deutlich reduziert. Zusätzlich entwickelte sich eine Keratitis rechts. In der Sektion fand sich eine Splenomegalie mit derben linsengroßen Infiltraten, die sich auch im Darm und der Bauchmuskelfaszie zeigten. Die Leber und die Nieren waren makroskopisch unauffällig. Die histologische Untersuchung ergab ein malignes Lymphom mit Infiltraten in Milz, Herz, Darm und der Bauchmuskelfaszie.

Kaninchen 68: *Virusinfektion, PBS-Behandlung*

Gegen Ende des Versuches kam es bei diesem Tier zu einem rapiden Abfall des Allgemeinzustandes. Es verstarb in der 23. Woche p.i. Die Milz war makroskopisch nur leicht vergrößert und besaß einen linsengroßen zentralen Herd. Weitere Infiltrate mit ähnlichem Erscheinungsbild fanden sich in beiden Nieren. Die mikroskopische Untersuchung ergab mittel- bis großzellige Tumorzellinfiltrate in Milz, Leber, Nieren, Herz und Lunge, die histologisch als malignes Lymphom diagnostiziert wurden.

Kaninchen 69: *Virusinfektion, PBS-Behandlung*

Dieses Tier war im Gegensatz zu den anderen Versuchstieren weder klinisch, noch makro- oder mikroskopisch auffällig. Es konnte kein Tumor gefunden werden.

Kaninchen 70: *Virusinfektion, PBS-Behandlung*

Klinisch fiel dieses Tier durch eine persistierende Erkrankung des oberen Respirationstraktes (Rhinitis) auf, es verstarb kurz vor Ende des Versuches in der 20. Woche p.i. Bei der Sektion fanden sich multiple helle stecknadelkopf- bis linsengroße Herde in Milz, Leber, Nieren und Lunge. Histologisch zeigten sich unsystematisierte polymorphzellige Infiltrate mit Nekrosen und Riesenkernbildungen, die als malignes Lymphom klassifiziert wurden. In der Lunge wurde neben den Tumordinfiltraten eine beginnende Herdpneumonie diagnostiziert.

Kaninchen 71: *Virusinfektion, PBS-Behandlung*

Dieses Tier verstarb frühzeitig in der achten Woche p.i. Makroskopisch waren Milz und Leber vergrößert und zeigten weißliche linsengroße Herde. Histologisch wurden diese als malignes Lymphom bewertet.

Kaninchen 72: *Virusinfektion, PBS-Behandlung*

Dieses Tier war klinisch unauffällig. Makroskopisch waren keine Organveränderungen erkennbar, und auch die Histologie konnte kein malignes Tumorgeschehen nachweisen.

Tabelle 6: Einteilung der Versuchstiere und Übersicht über die pathologisch-anatomischen Befunde

Kan.- Nr.	Virus- infektion	<u>Cidofovir</u> PBS	Tod in Woche p.i.	makroskopische Veränderung	Histologische Befunde
59	Nein	–	24	Nein	unauffällig
60	Nein	Cidofovir	24	Nein	unauffällig
61	Nein	Cidofovir	24	Nein	unauffällig
62	Ja	Cidofovir	24	Ja	malignes Lymphom Infiltrate in Milz; Nieren
63	Ja	Cidofovir	12	Ja	malignes Lymphom Infiltrate in Milz; Nieren, Leber; Bauchmuskel- faszie; Haut; Fettgewebe
64	Ja	Cidofovir	11	Ja	malignes Lymphom Infiltrate in Milz; Leber; Darm, Zwerchfell; Fettgewebe
65	Ja	Cidofovir	19	Ja	malignes Lymphom Infiltrate in Milz; Nieren; Haut
66	Ja	Cidofovir	18	Ja	malignes Lymphom Infiltrate in Milz; Nieren; Leber; Herz; Lunge; Haut; Bauchmuskelfaszie; Fettgewebe; Kiefer
67	Ja	Cidofovir	24	Ja	malignes Lymphom Infiltrate in Milz; Leber; Herz; Darm; Bauch- muskelfaszie
68	Ja	PBS	23	Ja	malignes Lymphom Infiltrate in Milz; Nieren Leber; Herz, Lunge
69	Ja	PBS	24	Nein	unauffällig
70	Ja	PBS	20	Ja	malignes Lymphom Infiltrate in Milz; Nieren Leber; Herz; Lunge
71	Ja	PBS	8	Ja	malignes Lymphom Infiltrate in Milz; Nieren Leber; Herz; Lunge
72	Ja	PBS	24	Nein	unauffällig

5.2.2. Ergebnisse der HVMA-PCR mit Plasma-DNA

In der pol-PCR zum Nachweis von HVMA mit Plasma-DNA waren vor Versuchsbeginn alle Kaninchen negativ, so dass eine schon bestehende endogene Infektion mit einem EBV-verwandten Herpesvirus ausgeschlossen werden konnte. Bis zum Versuchsende in der 24. Woche p.i. oder dem vorzeitigem Tod wurde den Tieren wöchentlich Blut entnommen und aus Plasma bzw. Zellen die DNA extrahiert. Insgesamt wurden 293 Plasma-Proben mittels PCR untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind nachfolgend sowie in Tabelle 7 aufgelistet.

Kaninchen 59: *keine Virusinfektion, keine Behandlung*

Im gesamten Versuchsverlauf waren die Ergebnisse der Plasma-PCR negativ.

Kaninchen 60, 61: *keine Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

Diese ebenfalls nicht mit dem Virus infizierten Kaninchen waren bis zur 24. Woche p.i., dem Versuchsende, durchgehend in der PCR negativ.

Kaninchen 62: *Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

Das Kaninchen war mit Ausnahme der 23. Versuchswoche ab der 3. Woche p.i. bis zum Versuchsende in der PCR kontinuierlich positiv.

Kaninchen 63: *Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

In der PCR war dieses Tier ab der 3. Woche mit Ausnahme der 5. Woche durchgehend positiv.

Kaninchen 64: *Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

Auch dieses Tier war ab der 3. Woche p.i. bis auf die 5. Woche kontinuierlich positiv.

Kaninchen 65: *Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

Das Kaninchen war ab der 3. Woche p.i. bis zu seinem Tod (19. Woche) in der PCR positiv. In der 6. und 7. Woche wurden nur schwach positive Werte gemessen.

Kaninchen 66: *Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

Dieses Versuchstier war ab der 3. Woche p.i. bis zu seinem Tod in der 18. Woche durchgehend positiv.

Kaninchen 67: *Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

Ab der 3. Woche bis zum Versuchsende in der 24. Woche war das Plasma des Tieres positiv. In der 5. Woche zeigte sich kurzzeitig ein nur schwach positives Messergebnis.

Kaninchen 68: *Virusinfektion, PBS-Behandlung*

Die Ergebnisse der Plasma-PCR dieses Tieres fielen bis auf die 3. Woche p.i. negativ aus. Erst in der 22. und 23. Woche waren positive Resultate ermittelbar.

Kaninchen 69: *Virusinfektion, PBS-Behandlung*

Bei diesem Tier waren die PCR Ergebnisse vorwiegend negativ. Von der 3. bis 4. Woche wurden hingegen positive Resultate ermittelt. Danach waren außer in der 17. und 21. Woche die PCR-Ergebnisse bis zum Ende der Untersuchungen in der 24. Woche negativ.

Kaninchen 70: *Virusinfektion, PBS-Behandlung*

Dieses Kaninchen zeigte kontinuierlich positive PCR-Resultate ab der 3. Woche p.i. bis zu seinem Tod in der 20. Woche.

Kaninchen 71: *Virusinfektion, PBS-Behandlung*

Dieses Tier verstarb bereits zu Beginn der Versuche in der 8. Woche p.i. In der PCR wurden ab der 3. Woche positive Ergebnisse festgestellt.

Kaninchen 72: *Virusinfektion, PBS-Behandlung*

Die PCR-Resultate dieses Tieres waren bis auf die 3. Woche immer negativ.

5.2.2.1. Vergleich beider Testgruppen (Cidofovir vs. PBS)

Die Gruppe der Kaninchen 62-67 erhielt nach der Injektion von Viruspellet Cidofovir als Therapie. Die Plasma-PCR-Ergebnisse dieser Gruppe von Versuchstieren sind untereinander sehr ähnlich: Alle Kaninchen waren in den ersten beiden Wochen negativ, ab der 3. Woche p.i. dann positiv. Diese Positivität ist konstant bis zum Tod des jeweiligen Versuchstieres im Plasma nachzuweisen. Ausnahmen fanden sich in der 5. (Kaninchen 63, 64) und 23. (Kaninchen 62) Woche p.i., in denen sporadisch negative Resultate auftraten. Bis auf Kaninchen 62 entwickelten alle anderen Kaninchen mit diesem Behandlungsschema maligne Tumore und verstarben frühzeitig. Obwohl Kaninchen 62 klinisch unauffällig war, konnte in der Sektion ebenfalls ein maligner Tumor nachgewiesen werden.

Die Kaninchen 68-72 wurden mit dem Virus infiziert und mit PBS behandelt. Die Plasma-PCR-Ergebnisse dieser Gruppe waren untereinander heterogener als bei der zuvor beschriebenen Behandlungsgruppe. Die Tiere 69 und 72 zeigten bis auf wenige Ausnahmen (Kaninchen 69: 3., 4., 17. und 21. Woche; Kaninchen 72: 3. Woche) durchgehend negative Ergebnisse. Beide Tiere zeigten keine Auffälligkeiten im Allgemeinstatus, maligne Tumore konnten bei beiden histologisch nicht diagnostiziert werden. Im Gegensatz dazu wurde bei Kaninchen 68 ein Tumor makro- und mikroskopisch erkannt, obwohl auch bei diesem Tier mit Ausnahme der Wochen drei und 22 bis zur 23. Woche p.i. keine Virus-DNA in den untersuchten Proben nachgewiesen werden konnte. Die Versuchstiere 70 und 71 wiesen ab der 3. Woche kontinuierlich positive PCR-Resultate auf und verstarben vor dem Versuchsende in der 24. Woche nach Virusinfektion. Histologisch wurde bei beiden ein malignes Non-Hodgkin-Lymphom gefunden.

5.2.2.2. Vergleich zwischen Tieren mit und ohne Tumor

Bei den Tieren sowohl mit als auch ohne Tumorentwicklung fällt auf, dass in der 3. Woche positive PCR-Ergebnisse auftraten. Die Tiere mit malignem Tumor waren anschließend bis auf wenige Ausnahmen (Kaninchen 62: 23. Woche; Kaninchen 63 und 64: 5. Woche) kontinuierlich bis zu ihrem Tod bzw. dem Versuchsende in der PCR positiv. Einzige Ausnahme stellt Kaninchen 68 dar, welches ebenfalls ein malignes Lymphom entwickelte, aber in der Plasma-PCR nur kurzzeitig in der 3.

Woche und später wieder in der 22. und 23. Woche positive Ergebnisse hatte. Von der 5. bis zur 21. Woche war dieses Tier sowohl in der PCR negativ als auch klinisch unauffällig. Erst in den letzten beiden Wochen verschlechterte sich der Allgemeinstatus rapide. Dagegen waren die Tiere ohne Tumorentwicklung (Kaninchen 69 und 72) nur vorübergehend in der 3. Woche p.i. positiv. Im weiteren Verlauf konnten überwiegend negative bzw. nur vereinzelt schwach positive Ergebnisse (Kaninchen 69: 4., 17. und 21. Woche) verzeichnet werden.

Tabelle 7: Ergebnisse der PCR mit Plasma-DNA zum Nachweis von HVMA

Kan. Nr.	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
Tumor	KO	KO	KO	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	∅	⊕	⊕	∅
Woche														
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
5	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-
6	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
7	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
8	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
9	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+		-
10	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+		-
11	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+		-
12	-	-	-	+	+		+	+	+	-	-	+		-
13	-	-	-	+			+	+	+	-	-	+		-
14	-	-	-	+			+	+	+	-	-	+		-
15	-	-	-	+			+	+	+	-	-	+		-
16	-	-	-	+			+	+	+	-	-	+		-
17	-	-	-	+			+	+	+	-	+	+		-
18	-	-	-	+			+	+	+	-	-	+		-
19	-	-	-	+			+		+	-	-	+		-
20	-	-	-	+					+	-	-	+		-
21	-	-	-	+					+	-	+			-
22	-	-	-	+					+	+	-			-
23	-	-	-	-					+	+	-			-
24	-	-	-	+					+		-			-

⊕ histologisch maligner Tumor nachgewiesen

∅ histologisch kein maligner Tumor nachgewiesen

KO Kontrolltier

+ positives PCR-Ergebnis

- negatives PCR-Ergebnis

5.2.3. Ergebnisse der qualitativen HVMA-PCR mit Leukozyten-DNA

Während des Versuches wurden aus den wöchentlich entnommenen Blutproben neben Plasma auch Leukozyten gewonnen. Die extrahierte DNA wurde mit Hilfe der PCR zuerst qualitativ untersucht. Das Ergebnis einer solchen PCR ist als Beispiel in Abbildung 4 dargestellt. Bei positivem Ergebnis wurde im Anschluss quantitativ die Anzahl der HVMA-Virus-Genom-Kopien bestimmt. Insgesamt wurden 293 Proben bearbeitet. In der PCR mit Leukozyten-DNA aus der Woche vor Versuchsbeginn waren alle Versuchstiere negativ, das heißt es wurde keine HVMA-DNA nachgewiesen. Eine latent vorhandene Infektion der Tiere vor Versuchsbeginn konnte somit ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der qualitativen HVMA-PCR mit Leukozyten-DNA sind im folgenden Abschnitt sowie in Tabelle 8 aufgelistet.

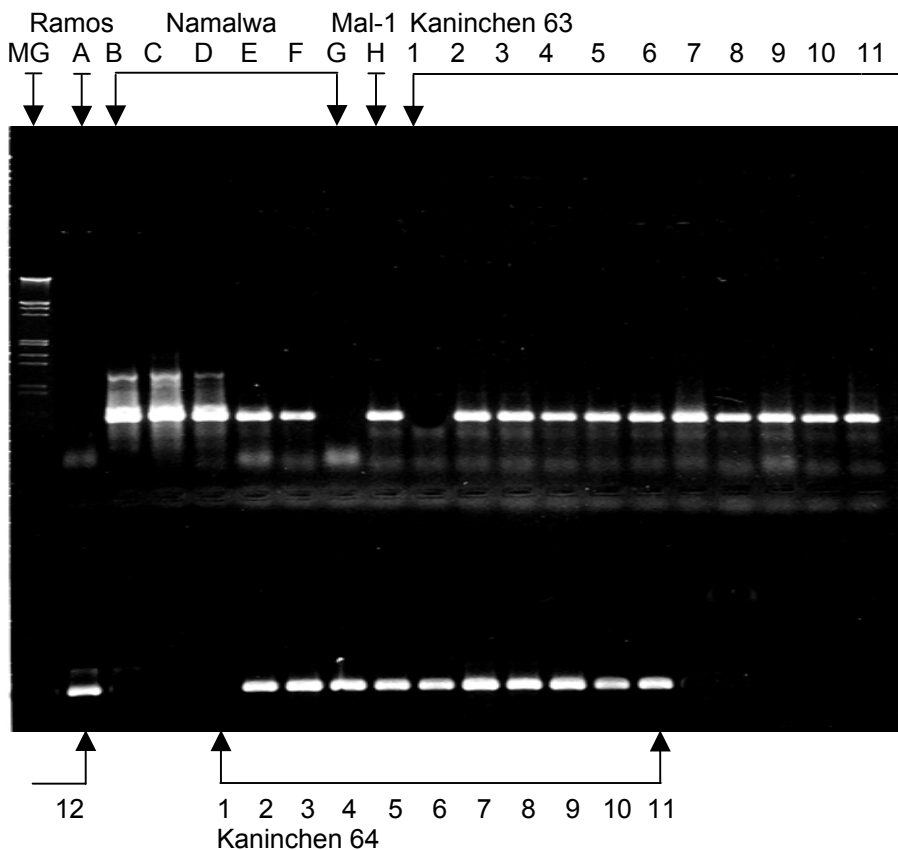


Abb. 4: Gel-Elektrophorese der HVMA-nested-PCR-Amplifikate mit Leukozyten-DNA von Kaninchen 63 und 64

MG Molekulargewichtsmarker

A Ramos-Zell-DNA 100 ng

H MAL-1-Zell-DNA 100 pg

B - G Namalwa-Zell-DNA 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1pg

Kaninchen 63, 1-12: Leukozyten-DNA von Kaninchen 63 1.-12. Woche p.i.

Kaninchen 64, 1-11: Leukozyten-DNA von Kaninchen 64 1.-11. Woche p.i.

Kaninchen 59: *keine Virusinfektion, keine Behandlung*

Die Resultate der PCR mit Leukozyten-DNA waren über den gesamten Versuchszeitraum negativ.

Kaninchen 60, 61: *keine Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

Diese nur mit Cidofovir behandelten und nicht infizierten Kaninchen zeigten in der PCR bis zur 24. Woche ausschließlich negative Ergebnisse.

Kaninchen 62: *Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

Die PCR-Ergebnisse dieses Versuchstieres zeigten ab der 2. bis zur 24. Woche p.i. in den Zellen kontinuierlich positive Resultate.

Kaninchen 63: *Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

Die Ergebnisse der PCR mit Leukozyten-DNA waren bei diesem Tier ab der 2. Woche p.i. bis zum Tod in der 12. Woche p.i. positiv.

Kaninchen 64: *Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

In der PCR war das Kaninchen ab der 2. Woche bis zu seinem Tod in der 11. Woche positiv.

Kaninchen 65: *Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

Die PCR-Ergebnisse dieses Tieres wiesen ab der 2. Woche bis zu seinem Tod in der 19. Woche kontinuierlich positive Resultate auf.

Kaninchen 66: *Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

Bis zum Tod in der 18. Woche p.i. waren die PCR-Resultate dieses Tieres ab der 2. Woche p.i. durchgehend positiv.

Kaninchen 67: *Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

Ab der 2. Woche p.i. waren die PCR-Resultate dieses Tieres immer positiv.

Kaninchen 68: *Virusinfektion, PBS-Behandlung*

Dieses Kaninchen zeigte in der Leukozyten-PCR einen wechselhaften Verlauf. Wie alle anderen Versuchstiere war es in der 1. Woche p.i. noch negativ, danach bis zur 4.

positiv und abermals von der 5. bis zur 7. sowie in der 9. Woche negativ. Von der 10. Woche an bis zum Tod in der 23. Woche war die PCR des Tieres positiv.

Kaninchen 69: *Virusinfektion, PBS-Behandlung*

Das Kaninchen hatte abwechselnd positive und negative Ergebnisse in der PCR. Nach negativem Resultat in der 1. Woche war es bis zur 8. Woche positiv, dann in der 9. negativ und danach mit Ausnahme der 13. Woche erneut positiv.

Kaninchen 70: *Virusinfektion, PBS-Behandlung*

Bei diesem Tier war das PCR-Ergebnis in der 1. Woche negativ, ab der 2. bis zum Tod in der 20. Woche p.i. hingegen kontinuierlich positiv.

Kaninchen 71: *Virusinfektion, PBS-Behandlung*

Die PCR-Ergebnisse dieses Versuchstieres zeigten ein negatives Resultat in der 1. Woche und positive Ergebnisse in den folgenden Wochen. Das Kaninchen verstarb relativ frühzeitig in 8. Woche p.i.

Kaninchen 72: *Virusinfektion, PBS-Behandlung*

Bei diesem Versuchstier waren die PCR-Resultate mit Leukozyten-DNA äußerst wechselhaft. Die PCR ergab für die 1. Woche ein negatives, für die 2. und 3. Woche aber ein positives Ergebnis. Die folgenden vier Wochen zeigten negative Resultate, dagegen war die PCR der 8. bis 10. Woche wieder positiv. Die Ergebnisse der PCR waren in der 11. und 12. Woche erneut negativ, ab der 13. Woche fanden sich dann jedoch durchweg bis zum Ende der Versuche in der 24. Woche p.i. positive Resultate.

5.2.3.1. Vergleich beider Testgruppen (Cidofovir vs. PBS)

Die Gruppe der Kaninchen 62-67 wurde sowohl mit Viruspellet infiziert als auch mit Cidofovir behandelt. Die PCR-Ergebnisse mit Leukozyten-DNA dieser Gruppe von Versuchstieren sind untereinander gleich und haben Ähnlichkeiten mit den Ergebnissen der Plasma-PCR. Alle Kaninchen weisen in der 1. Woche negative Ergebnisse auf, die erst danach in positive umschlagen. Diese Positivität ist konstant bis zum Tod des jeweiligen Versuchstieres in der Leukozyten-DNA-PCR nachzuweisen. Mit Ausnahme von Kaninchen 62, welches klinisch unauffällig blieb und bei dem erst in der Sektion ein Tumor gefunden wurde, entwickelten alle Kaninchen mit diesem Behandlungsschema maligne Tumore und verstarben frühzeitig.

Die PCR-Ergebnisse der Virus-infizierten, aber mit PBS behandelten Kaninchen 68-72 waren untereinander heterogen. Gemeinsam ist allen Tieren, dass sie in der 2. Woche p.i. positiv sind. Die Versuchstiere 70 und 71 zeigten ein ähnliches Verhalten wie die Tiere der mit Cidofovir behandelten Gruppe. Sie wiesen beide ab der 2. Woche positive PCR-Resultate auf, verstarben vor Versuchsende und entwickelten maligne Tumore. Nummer 68 war zu Beginn des Versuches zeitweise negativ (5. bis 7. und 9. Woche), aber ab der 10. bis zu seinem Tod in der 23. Woche kontinuierlich positiv. Die Tiere 69 und 72 fielen während der Versuche bei ansonsten positivem Verlauf immer wieder kurzzeitig mit negativen PCR-Resultaten auf. Beide überlebten bis zum Versuchsende in der 24. Woche, histologisch konnte kein Tumor gefunden werden.

5.2.3.2. Vergleich zwischen Tieren mit und ohne Tumor

Unabhängig davon, ob die Tiere einen Tumor entwickelten oder nicht, waren alle PCR-Ergebnisse der Versuchstiere in der 2. Woche positiv. Die Tiere mit Tumorentwicklung, mit Ausnahme von Kaninchen 68, blieben bis zu ihrem Tod kontinuierlich positiv. Dieses Kaninchen 68 war von der 5. bis zur 7. und erneut in der neunten Woche negativ. Danach war es ebenfalls kontinuierlich positiv.

Bei den Tieren ohne Tumor fanden sich wiederholt kurzzeitig negative PCR-Resultate. Erst ab der 14. Woche waren sie in der Leukozyten-PCR positiv.

Tabelle 8: Ergebnisse der PCR mit Leukozyten-DNA zum Nachweis von HVMA

Kan. Nr.	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
Tumor	KO	KO	KO	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	∅	⊕	⊕	∅
Woche														
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
5	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
6	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
7	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
8	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+		+
10	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
11	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+		-
12	-	-	-	+	+		+	+	+	+	+	+		-
13	-	-	-	+			+	+	+	+	-	+		+
14	-	-	-	+			+	+	+	+	+	+		+
15	-	-	-	+			+	+	+	+	+	+		+
16	-	-	-	+			+	+	+	+	+	+		+
17	-	-	-	+			+	+	+	+	+	+		+
18	-	-	-	+			+	+	+	+	+	+		+
19	-	-	-	+			+		+	+	+	+		+
20	-	-	-	+					+	+	+	+		+
21	-	-	-	+					+	+	+			+
22	-	-	-	+					+	+	+			+
23	-	-	-	-					+	+	+			+
24	-	-	-	+					+		+			+

⊕ histologisch maligner Tumor nachgewiesen

∅ histologisch kein maligner Tumor nachgewiesen

KO Kontrolltier

+ positives PCR-Ergebnis

- negatives PCR-Ergebnis

5.2.4. Ergebnisse der quantitativen HVMA-PCR mit Leukozyten-DNA

Zur Quantifizierung der HVMA-DNA in den Leukozyten wurde die Anzahl der Virus-Genom-Kopien pro 10^5 Zellen berechnet. Dafür wurde die Zell-DNA-Konzentration mittels Spektrometrie bestimmt und in einer Verdünnungsreihe mit dem Faktor 4 in die PCR und nested-PCR eingesetzt. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde die letzte noch sichtbare Bande gewertet und die Anzahl der HVMA-Genom-Kopien berechnet. In Abbildung 5 ist das Ergebnis einer solchen nested-PCR dargestellt.

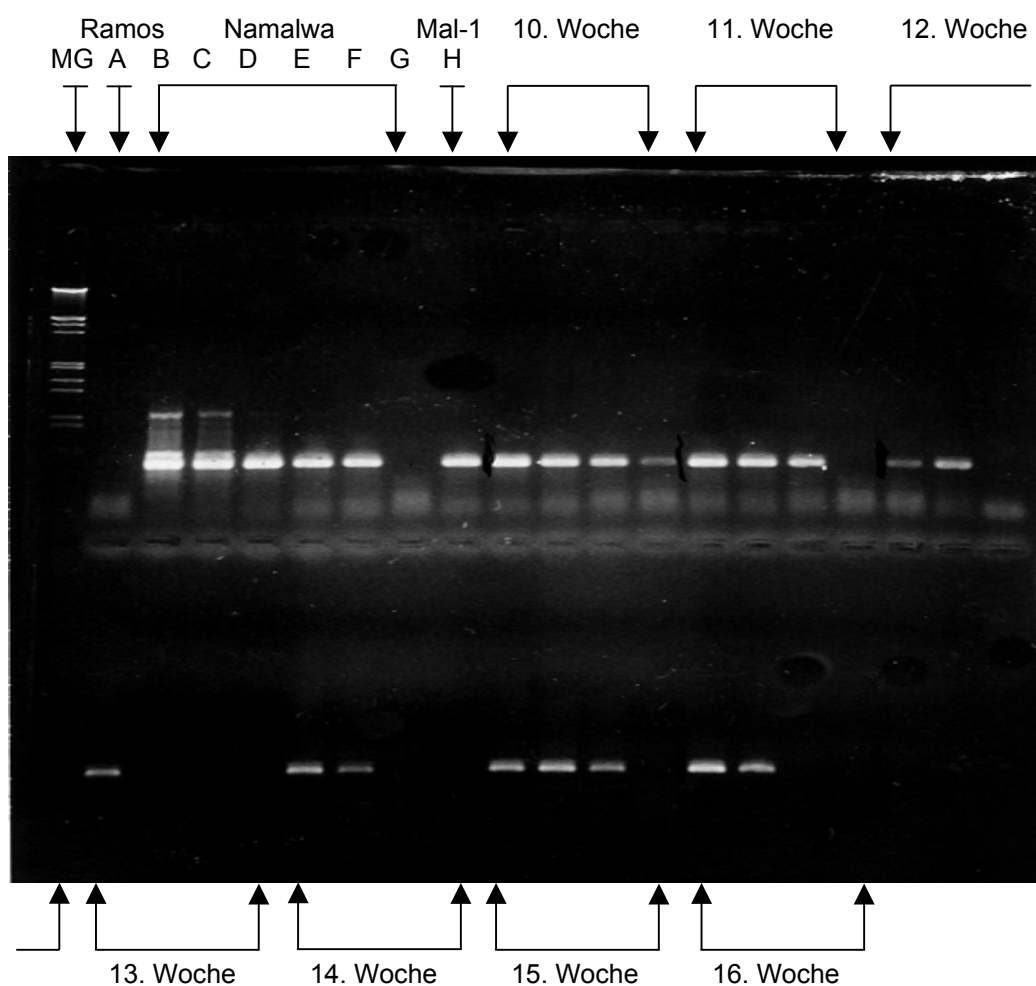


Abb. 5: Gel-Elektrophorese der quantitativen HVMA-PCR mit Leukozyten-DNA von Kaninchen 65

MG Molekulargewichtsmarker

A Ramos-Zell-DNA 100 ng

B - G Namalwa-Zell-DNA 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg

H MAL-1-Zell-DNA 100 pg

Leukozyten-DNA von Kaninchen 65, 10. Woche p.i. bis 16. Woche p.i.; Verdünnung 1:4, 1:16, 1:32; 1:64

Die quantitative HVMA-PCR mit Leukozyten-DNA ergab folgende Ergebnisse:

Kaninchen 59: *keine Virusinfektion, keine Behandlung*

Dieses Tier war in der qualitativen PCR mit Leukozyten-DNA kontinuierlich negativ, so dass eine Infektion auszuschließen ist.

Kaninchen 60, 61: *keine Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

Auch diese beiden Tiere zeigten in der qualitativen PCR mit Leukozyten-DNA durchweg negative Ergebnisse, eine Infektion ist deshalb auszuschließen.

Kaninchen 62: *Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

Dieses Tier war in den Zellen in der 1. Woche p.i. negativ. Schon in der darauffolgenden Woche fanden sich rund 3000 Virus-Genom-Kopien in den Leukozyten. In der 3. und 4. Woche erreichten die HVMA-Genom-Kopien ihre Höchstwerte von rund 60.000. Danach pegelten sich die Werte auf durchschnittlich 7000 Virus-Genom-Kopien ein. In der 12., 15., 21. und 23. Woche finden sich kurzzeitig „peaks“, in denen die Virus-Genom-Kopien über 10.000 pro 10^5 Zellen steigen. In der 23. Woche lagen die Ergebnisse der quantitativen PCR mit Leukozyten-DNA mit 50.000 Virus-Genom-Kopien relativ hoch.

Kaninchen 63: *Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

Bei diesem Tier waren in den Zellen schon in der 2. Woche rund 300 Virus-Genom-Kopien nachgewiesen wurden. In der 3. Woche p.i. stiegen die HVMA-Genom-Kopien auf 15.000, fielen danach aber drastisch auf rund 100 Virus-Genom-Kopien ab. Danach kam es erneut zum Anstieg auf durchschnittlich 5500. In der 5. Woche waren die Kopienzahlen mit rund 50 HVMA-Genom-Kopien auf dem niedrigsten Niveau.

Kaninchen 64: *Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

Bei Kaninchen 64 konnten schon in der 2. Woche rund 2000 HVMA-Genom-Kopien festgestellt werden. In der folgenden Woche p.i. war ein drastischer Anstieg auf rund 140.000 Virus-Genom-Kopien zu verzeichnen, der höchste Wert, der bei diesem Tier im gesamten Versuchszeitraum gefunden wurde. In der 5. Woche waren die Kopienzahlen mit 200 Virus-Genom-Kopien niedrig, aber ab 6.-11. Woche wurden

mit durchschnittlich 4000 HVMA-Genom-Kopien wieder deutlich steigende Werte gemessen.

Kaninchen 65: *Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

In der 2. Versuchswoche wurden bei diesem Tier rund 4000 Virus-Genom-Kopien in den Leukozyten gemessen. Die Höchstwerte der HVMA-Genom-Kopien traten in der 6., 9., 10. und 19. Woche p.i. mit Werten zwischen 10.000 und 50.000 Virus-Genom-Kopien pro 10^5 Zellen auf. Die durchschnittliche Anzahl der Virus-Genom-Kopien lag bei 7000, wobei beachtet werden muss, dass in der 5., 8. und 13. Woche die Werte auf ca. 300 Virus-Genom-Kopien oder sogar darunter sanken.

Kaninchen 66: *Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

Nachdem die PCR zu Versuchsbeginn p.i. in den Zellen bei diesem Tier negative Ergebnisse brachte, stiegen die HVMA-Genom-Kopien zwischen der 2. und 3. Woche bis zum Höchstwert von 150.000 an. Bis auf wenige Ausnahmen waren die Werte mit durchschnittlich 2500 HVMA-Genom-Kopien relativ konstant, aber einerseits erhöhten sich die Werte in der 6. und 18. Woche auf rund 10.000, andererseits fielen sie in der 8., 9. und 15. Woche auf nur 100 Virus-Genom-Kopien.

Kaninchen 67: *Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

In den Zellen von Kaninchen 67 konnten bereits eine Woche nach Beginn 100 Virus-Genom-Kopien gefunden werden. In der 4. und 5. Woche wurden Höchstwerte von rund 10.000 Kopien gemessen, die später nur noch in der 13. und 17. Woche annähernd wieder erreicht wurden. Zwischen der 5. und 18. Woche lagen die errechneten Werte bei rund 3500 Genom-Kopien pro 10^5 Leukozyten. Gegen Ende des Versuches sanken die Kopienzahlen trotz gleichbleibend positiver PCR-Ergebnisse auf 100 HVMA-Genom-Kopien oder darunter ab.

Kaninchen 68: *Virusinfektion, PBS-Behandlung*

Bei der quantitativen PCR mit Zell-DNA konnten ab der 2. Woche p.i. 1000 Virus-Genom-Kopien ermittelt werden. Diese Werte fielen ab der 4. Woche auf ca. 300 ab und lagen in den Wochen fünf, sieben und neun unter der Nachweisgrenze von 50 HVMA-Genom-Kopien. In den folgenden zwölf Wochen lagen die Kopienzahlen mit

durchschnittlich 500 Virus-Genom-Kopien auf niedrigem Niveau. Erst in den letzten 14 Tagen stiegen die Werte auf rund 25.000 HVMA-Genom-Kopien an.

Kaninchen 69: *Virusinfektion, PBS-Behandlung*

Die Kopienzahlen stiegen bei diesem Tier schon in der 2. Woche auf 15.000 Virus-Genom-Kopien an. Danach fielen die Werte auf durchschnittlich unter 1000 ab und lagen in der 9. und 13. Woche sogar unter der Nachweisgrenze. In den folgenden Versuchswochen traten kurzzeitig immer wieder Werte von weniger als 50 HVMA-Genom-Kopien auf. Nur in der 17. und in der 23. Woche waren vorübergehend 4000 Virus-Genom-Kopien feststellbar, die anschließend wieder abfielen.

Kaninchen 70: *Virusinfektion, PBS-Behandlung*

Bei diesem Tier konnte ein Anstieg der HVMA-Genom-Kopien auf 40.000 schon ab der 2. Woche p.i. gefunden werden. Das Kaninchen wies mehrfach Höchstwerte von über 100.000 Virus-Genom-Kopien auf (6., 9., 16. und 20. Woche). Auch in den dazwischen liegenden Versuchswochen zeigte dieses Versuchstier mit durchschnittlich 16.000 Virus-Genom-Kopien relativ hohe Werte.

Kaninchen 71: *Virusinfektion, PBS-Behandlung*

Ab der 2. Woche p.i. stiegen die HVMA-Genom-Kopien von Kaninchen 71 steil an und erreichten nur sieben Tage später einen ersten Höchstwert von ca. 35.000 Virus-Genom-Kopien. In den folgenden Versuchswochen fielen die Werte auf durchschnittlich 13.000 Kopien ab, befanden sich damit aber immer noch auf hohem Niveau. Mit über 200.000 Kopien war der Höchststand am Versuchsende in der 8. Woche erreicht.

Kaninchen 72: *Virusinfektion, PBS-Behandlung*

Die HVMA-Genom-Kopien stiegen bei diesem Tier ab der 2. Woche bis zu einem Höchstwert von 10.000 Virus-Genom-Kopien in der 3. Woche p.i. an. Danach fielen die Werte auf durchschnittlich 150 Virus-Genom-Kopien pro 10^5 Zellen ab. Hierbei muss beachtet werden, dass die Werte über einen Zeitraum von sieben Wochen sogar unter der Nachweisgrenze von 50 Kopien lagen.

Zur übersichtlicheren Darstellung der Ergebnisse werden auf den folgenden Seiten grafisch die verschiedenen Verläufe der Anzahl der HVMA-Genom-Kopien für jedes

Kaninchen separat dargestellt. Für jede Versuchswoche sind die zugehörigen Ergebnisse der Plasma-PCR entweder mit einem roten Pfeil für ein positives oder mit einem grünen für ein negatives Ergebnis markiert.

Die Resultate sind anschließend in Tabelle 9 noch einmal zusammenfassend aufgelistet.

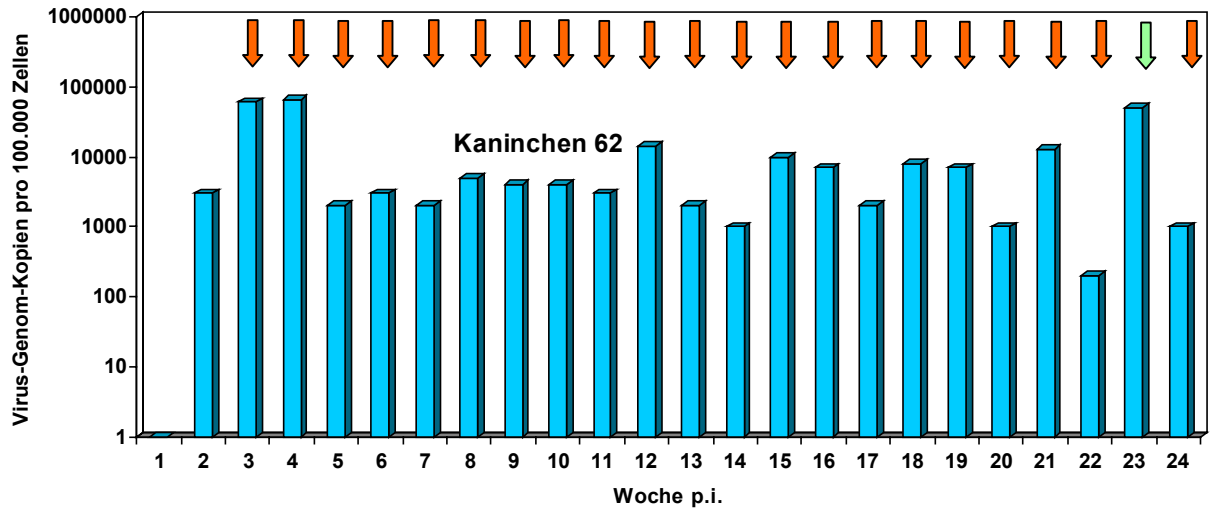


Abb. 7.1.

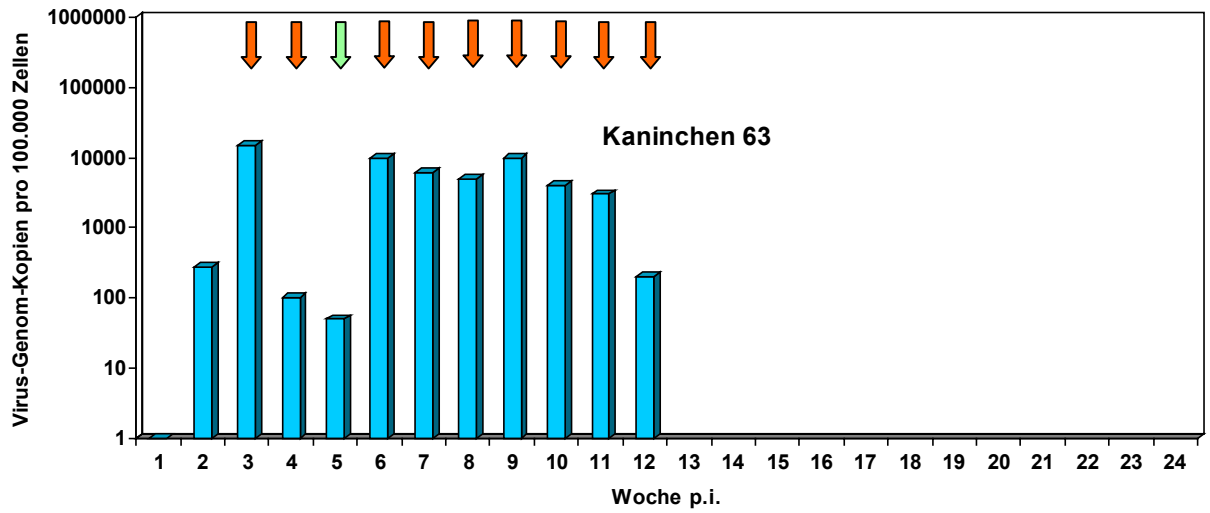


Abb. 7.2.

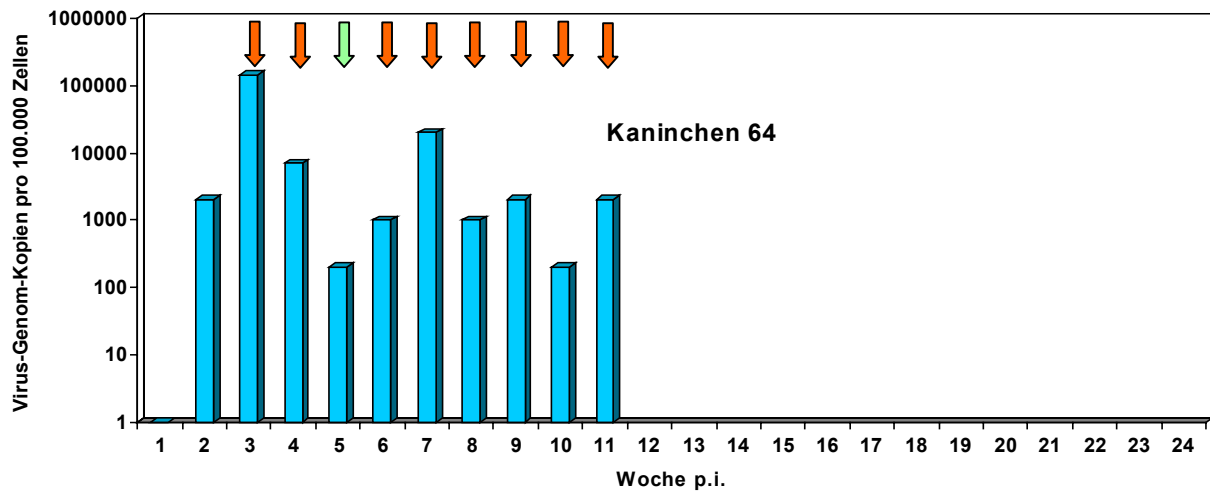


Abb. 7.3.

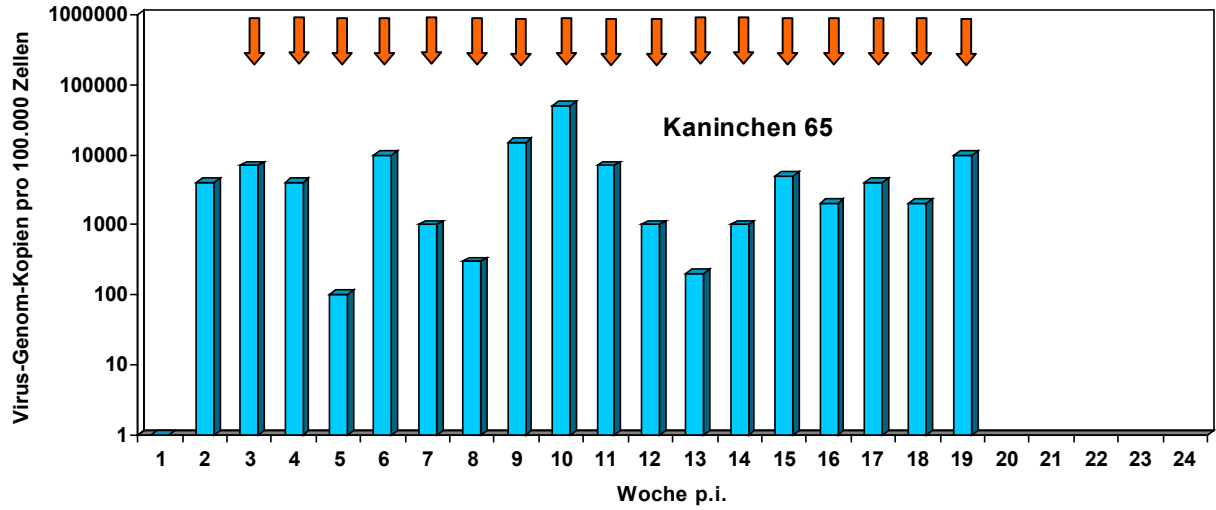


Abb. 7.4.

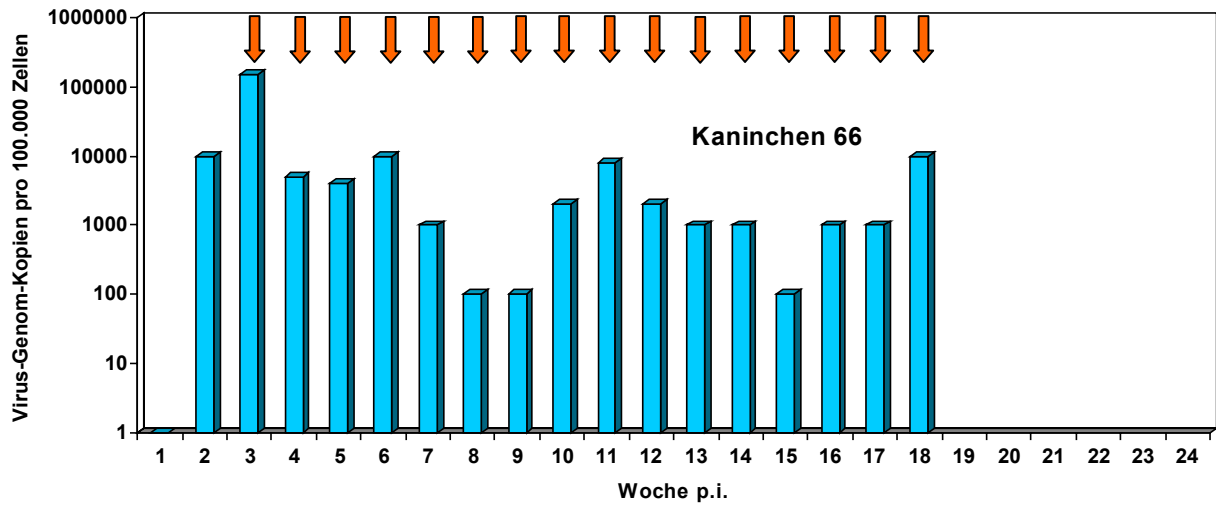


Abb. 7.5.

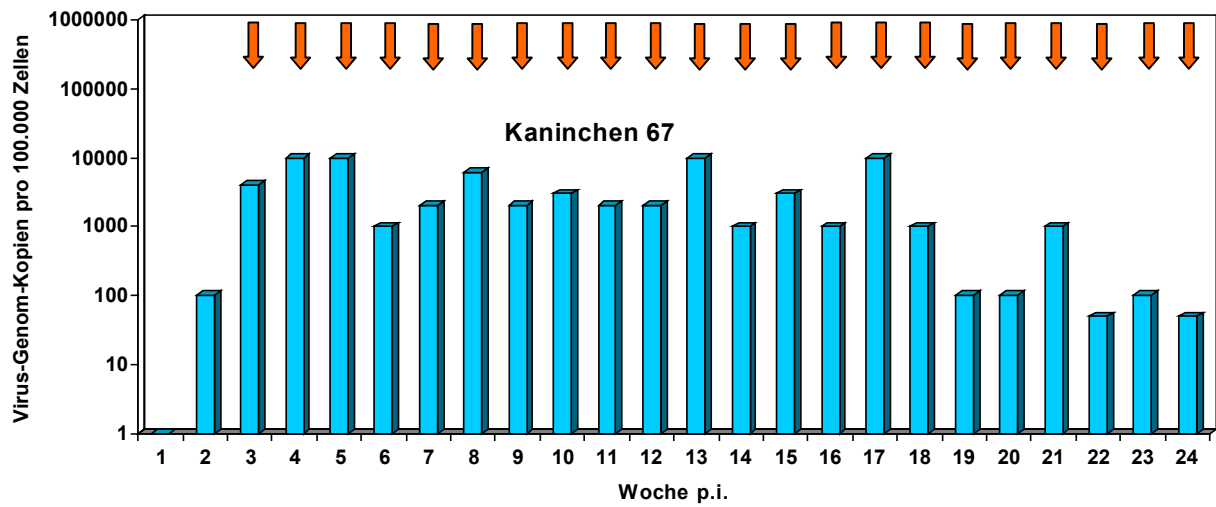


Abb. 7.6.

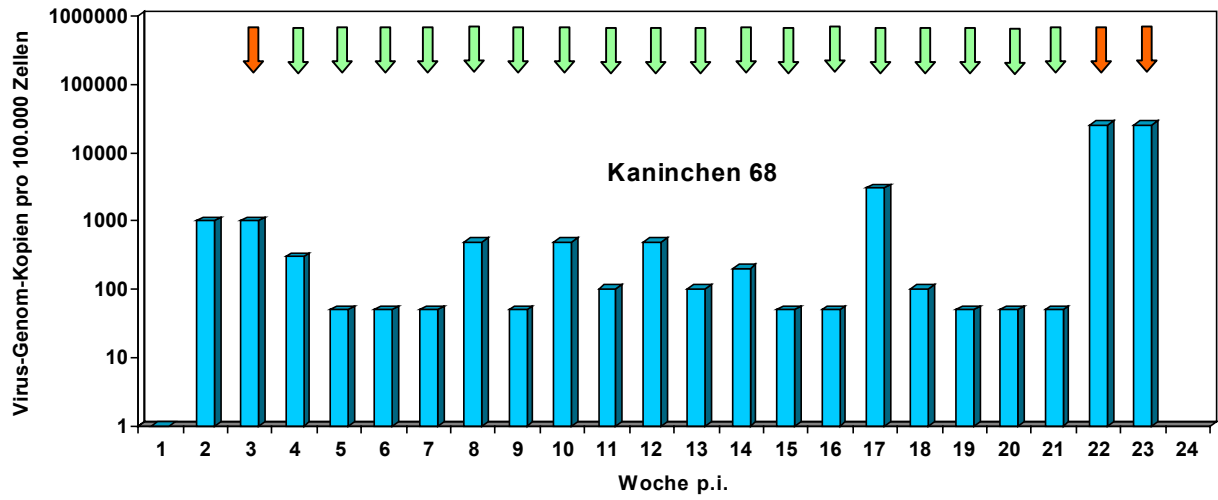


Abb. 7.7.

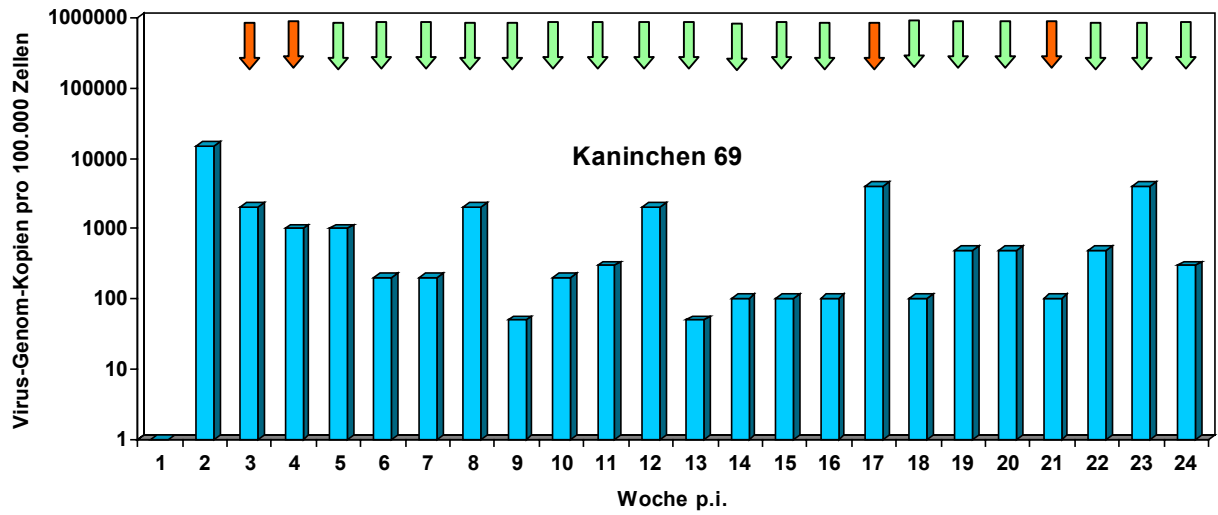


Abb. 7.8.

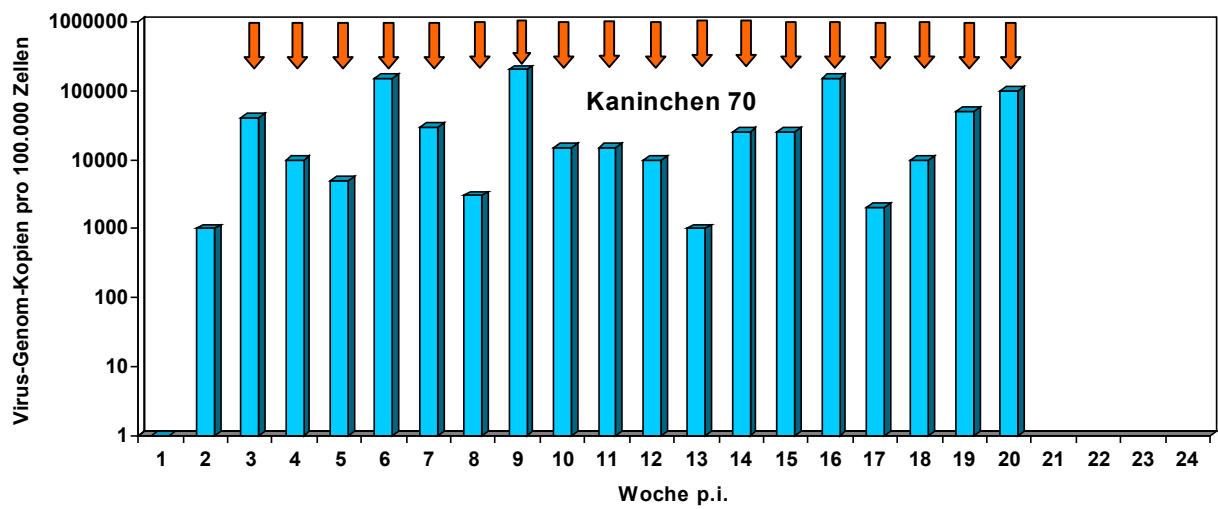


Abb. 7.9.

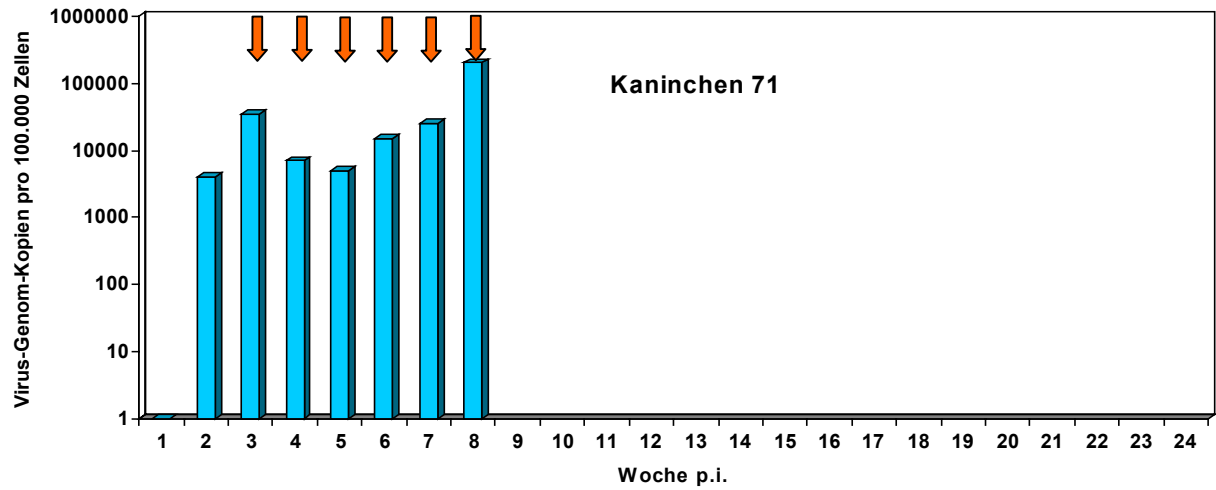


Abb. 7.10.

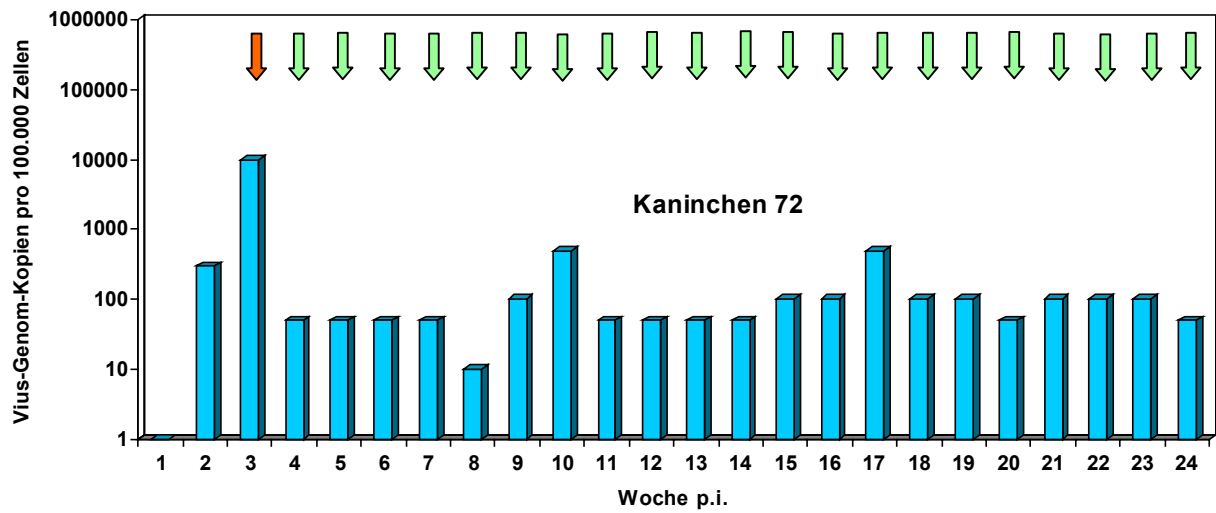


Abb. 7.11.

Abb. 7.1.-7.11. Ergebnisse der HVMA-PCR nach experimenteller Infektion im Kaninchen

↓ positive Plasma-PCR

↓ negative Plasma-PCR

5.2.4.1. Vergleich beider Testgruppen (Cidofovir vs. PBS)

Die Gruppe der Kaninchen 62-67 erhielt eine Injektion mit Viruspellet sowie Cidofovir als Therapie. Die Virus-Genom-Kopien verhielten sich hinsichtlich der absoluten Werte unterschiedlich. Gemeinsam ist allen Tieren dieser Gruppe jedoch, dass die Virus-Genom-Kopien und damit die Leukozyten schon ab der 2. Woche p.i. positiv waren. Außerdem erreichten alle Tiere in den ersten vier Wochen des Versuches im Verhältnis zu den folgenden Versuchswochen die höchste Anzahl an HVMA-Genom-Kopien. Danach sanken die Werte auf durchschnittlich 5000 Virus-Genom-Kopien und verblieben bis auf kurzzeitige „Ausreisser“ auf diesem Niveau. Gegen Ende der Versuche konnten keine Regelmäßigkeiten im Sinne eines Anstiegs oder Abfalls der HVMA-Genom-Kopien festgestellt werden. Die Werte sind teilweise präfinal am niedrigsten, bei anderen wiederum deutlich erhöht. Die mit dem Virus infizierten und mit PBS behandelten Kaninchen 68-72 zeigten ebenso heterogene Ergebnisse im Vergleich zur zuvor betrachteten Versuchsgruppe. Die Tiere 69 und 72 verzeichneten in der 2. und 3. Woche p.i. einen Anstieg der Virus-Genom-Kopien auf rund 12.500. Danach zeigte sich ein deutlicher Abfall auf durchschnittlich 1000 Virus-Genom-Kopien. Bei diesen Tieren liegen in elf Versuchswochen die Werte für die HVMA-Genom-Kopien sogar unter der Nachweisgrenze von 50 Virus-Genomen pro 10^5 Zellen. Außerdem konnten bei beiden Tieren weder Auffälligkeiten im Allgemeinstatus, noch maligne Tumore histologisch gefunden werden.

Die Kaninchen 70 und 71 zeigten sieben Tage nach Beginn steigende HVMA-Genom-Kopien mit ersten Höchstwerten von rund 37.000 Virus-Genom-Kopien in der 3. Woche p.i. Danach sanken die Werte leicht, wurden aber mehrfach von Spitzenwerten mit über 100.000 Virus-Genom-Kopien unterbrochen. Beide Versuchstiere wiesen im Vergleich zu den anderen Kaninchen dieser Versuchsgruppe eine durchschnittlich höhere Anzahl an Virus-Genom-Kopien auf. Ihre Verläufe haben große Ähnlichkeit mit denen der Kaninchen 62 bis 67. Die Anzahl der HVMA-Virus-Genom-Kopien von Kaninchen Nummer 68 waren äußerst niedrig und bewegen sich bis zur 22. Woche mit durchschnittlich 500 Virus-Genom-Kopien noch unter dem Niveau der Kaninchen 69 und 72. Erst in den letzten beiden Versuchswochen stiegen die Werte deutlich auf 25.000 an. Der Verlauf der Anzahl der Virus-Genom-Kopien in den Leukozyten bei diesem Tier ähnelt dem der Kaninchen

69 und 72 , aber im Gegensatz zu diesen Tieren wurde bei Kaninchen 68 ein Tumor makro- und mikroskopisch erkannt.

5.2.4.2. Vergleich zwischen Tieren mit und ohne Tumor

Bei allen Tieren konnten in der 2. und 3. Versuchswoche die höchsten HVMA-Genom-Kopien-Werte nachgewiesen werden, die danach wieder auf ein deutlich niedrigeres und konstantes Niveau sanken. Bei den Tieren Nummer 69 und 72, welche keinen malignen Tumor bildeten, fiel auf, dass ihre durchschnittliche Anzahl an Virus-Genom-Kopien pro 10^5 Zellen deutlich niedriger war als die der anderen Versuchstiere, bei denen in der Sektion maligne Non-Hodgkin-Lymphome gefunden wurden. Die Messergebnisse von Kaninchen 68 verhielten sich zu denen der anderen Tiere ohne malignen Tumor genau umgekehrt: Sie stiegen nach niedrigen Anfangswerten zum Ende hin deutlich an.

Tabelle 9: Ergebnisse der quantitativen HVMA-PCR zur Berechnung der Virus-Genom-Kopien pro 10^5 Leukozyten

Kan.- Nr.	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
Tumor	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	∅	⊕	⊕	∅
Woche											
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	3000	280	2000	4000	10.000	100	1000	15.000	1000	4000	300
3	60.000	15.000	140.000	7000	150.000	4000	1000	2000	40.000	35.000	10.000
4	65.000	100	7000	4000	5000	10.000	300	1000	10.000	7000	<50
5	2000	50	200	100	4000	10.000	<50	1000	5000	5000	<50
6	3000	10.000	1000	10.000	10.000	1000	<50	200	150.000	15.000	<50
7	2000	6000	20.000	1000	1000	2000	<50	200	30.000	25.000	<50
8	5000	5000	1000	300	100	6000	500	2000	3000	200.000	100
9	4000	10.000	2000	15.000	100	2000	<50	<50	200.000	–	100
10	4000	4000	200	50.000	2000	3000	500	200	15.000	–	500
11	3000	3000	2000	7000	8000	2000	100	300	15.000	–	<50
12	14.000	200	–	1000	2000	2000	500	2000	10.000	–	<50
13	2000	–	–	200	1000	10.000	100	<50	1000	–	50
14	1000	–	–	1000	1000	1000	200	100	25.000	–	50
15	10.000	–	–	5000	100	3000	50	100	25.000	–	100
16	7000	–	–	2000	1000	1000	50	100	150.000	–	100
17	2000	–	–	4000	1000	10.000	3000	4000	2000	–	500
18	8000	–	–	2000	10.000	1000	100	100	10.000	–	100
19	7000	–	–	10.000	–	100	50	500	50.000	–	100
20	1000	–	–	–	–	100	50	500	100.000	–	50
21	13.000	–	–	–	–	1000	50	100	–	–	100
22	200	–	–	–	–	50	25.000	500	–	–	100
23	50.000	–	–	–	–	100	25.000	4000	–	–	100
24	1000	–	–	–	–	50	–	300	–	–	<50

⊕ histologisch maligner Tumor nachgewiesen

∅ histologisch kein maligner Tumor nachgewiesen

5.2.5. Ergebnisse des Virusnachweises im Kaninchengewebe

Die bei der Obduktion nach Versuchsende gewonnenen diversen Kaninchengewebe wurden mit Hilfe der PCR qualitativ und der anschließenden Southern-Blot-Hybridisierung semiquantitativ auf HVMA-DNA untersucht. Bis zur Durchführung der Untersuchungen wurden die Gewebe der Kaninchen bei -80°C aufbewahrt. Erst kurz vor Versuchsbeginn wurde aus maximal 25 mg Gewebe (Milz 10 mg) DNA extrahiert, in der PCR amplifiziert, durch Gel-Elektrophorese aufgetrennt und danach hybridisiert.

Insgesamt wurden 97 Gewebeproben untersucht. Abhängig von der Intensität des Signals wurden die Ergebnisse in schwach, mittel und stark positiv unterteilt. Eine solche Southern-Blot-Hybridisierung mit der dazugehörigen vorrangegangenen PCR ist in Abbildung 6 dargestellt. Nachfolgend werden die erarbeiteten Ergebnisse mit den Kaninchengeweben beschrieben, einen Überblick gibt Tabelle 10.

Kaninchen 59: *keine Virusinfektion, keine Behandlung*

Sowohl in der Southern-Blot-Hybridisierung als auch in der PCR wurden negative Resultate gefunden.

Kaninchen 60, 61: *keine Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

Die Gewebeproben dieser nicht mit Virus infizierten Kaninchen zeigten weder in der PCR noch in der Southern-Blot-Hybridisierung positive Signale.

Kaninchen 62: *Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

Die getesteten Proben dieses Kaninchens waren mit Ausnahme des Lungengewebes in der PCR positiv. In der anschließenden Southern-Blot-Hybridisierung waren alle Gewebe positiv, wobei die Milz das mit Abstand stärkste und die Lunge das schwächste Signal lieferte.

Kaninchen 63: *Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

Bis auf die Lunge waren bei diesem Tier alle Gewebeproben in der PCR positiv. In der anschließenden Southern-Blot-Hybridisierung blieb das Lungengewebe negativ, die anderen Proben waren stark positiv.

Kaninchen 64: *Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

Bei diesem Tier waren alle getesteten Gewebe sowohl in der PCR als auch in der Southern-Blot-Hybridisierung positiv.

Kaninchen 65: *Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

Sowohl in der Southern-Blot-Hybridisierung als auch in der PCR fanden sich bei diesem Tier positive Ergebnisse.

Kaninchen 66: *Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

Bei diesem Kaninchen waren alle Gewebeproben in der Southern-Blot-Hybridisierung und in der PCR positiv.

Kaninchen 67: *Virusinfektion, Cidofovir-Behandlung*

Die entnommenen Gewebeproben dieses Kaninchens waren in der Southern-Blot-Hybridisierung und in der PCR positiv.

Kaninchen 68: *Virusinfektion, PBS-Behandlung*

Die Resultate der Southern-Blot-Hybridisierung und der PCR waren bei diesem Tier positiv.

Kaninchen 69: *Virusinfektion, PBS-Behandlung*

Dieses Tier zeigte in der PCR in allen Organen negative Ergebnisse. Erst in der Southern-Blot-Hybridisierung konnten im Herz und in der Milz schwach positive Resultate gefunden werden. Die ebenfalls getesteten Organe Lunge, Leber und Nieren blieben auch in der Southern-Blot-Hybridisierung negativ.

Kaninchen 70: *Virusinfektion, PBS-Behandlung*

Alle Gewebeproben dieses Tieres waren sowohl in der Southern-Blot-Hybridisierung als auch in der PCR positiv.

Kaninchen 71: *Virusinfektion, PBS-Behandlung*

Alle getesteten Gewebeproben zeigten bei diesem Kaninchen sowohl in der PCR als auch in der Southern-Blot-Hybridisierung positive Ergebnisse.

Kaninchen 72: *Virusinfektion, PBS-Behandlung*

Mit Ausnahme der Milz waren bei diesem Tier alle Gewebeproben in der PCR negativ. Leber, linke Niere und Herz wiesen in der anschließend durchgeführten Southern-Blot-Hybridisierung schwach positive Ergebnisse auf, während rechte Niere und Lunge negativ blieben. Das getestete Milzgewebe zeigte in der Southern-Blot-Hybridisierung ein stark positives Ergebnis.

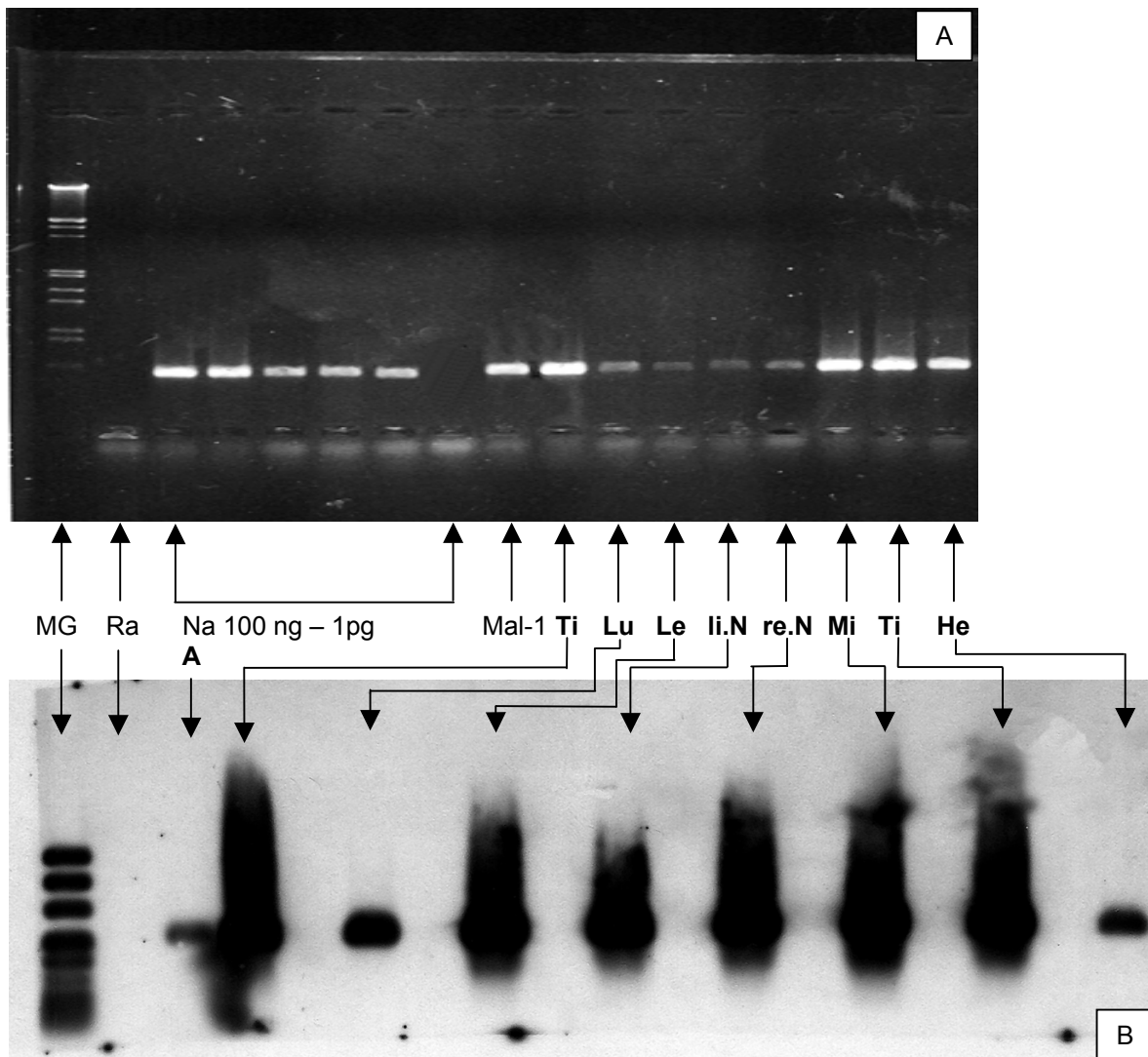


Abbildung 6: Gel-Elektrophorese (A) und Southern-Blot-Hybridisierung (B) der PCR mit Gewebe von Kaninchen 66

MG	Molekulargewichtsmarker	Ra	Ramos-Zell-DNA 100 ng
Na	Namalwa-Zell-DNA 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg	MAL-1	Zell-DNA 10 ng
A	Namalwa 100 pg		
Ti	Tumorinfiltrat Fettgewebe	Lu	Lunge
		Le	Leber
li. N	linke Niere	re.N	rechte Niere
		Mi	Milz
Ti	Tumorinfiltrat Fettgewebe	He	Herz

5.2.5.1. Vergleich beider Testgruppen (Cidofovir vs. PBS)

Bei den mit Virus infizierten und Cidofovir behandelten Kaninchen konnte in allen Organen und Geweben durch Southern-Blot-Hybridisierung Virus-DNA direkt nachgewiesen werden. Einzige Ausnahme bildete das Lungengewebe von Kaninchen 63, welches sowohl in der PCR als auch in der anschließenden Southern-Blot-Hybridisierung negativ blieb. In der mit PBS behandelten Gruppe waren alle getesteten Gewebe der Kaninchen 68, 70 und 71 positiv. Die Gewebeproben der Kaninchen 69 und 72 hatten in der PCR vollständig negative Ergebnisse gezeigt. Erst in der Southern-Blot-Hybridisierung konnte bei Kaninchen 69 in Herz und Milz sowie bei Kaninchen 72 in Herz, Leber, Milz und linker Niere Virus-DNA nachgewiesen werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zwischen beiden Testgruppen keine auf die Cidofovir- oder PBS-Behandlung bezogenen reproduzierbaren Unterschiede festzustellen sind.

5.2.5.2. Vergleich zwischen Tieren mit und ohne Tumor

Bei den Kaninchen 59, 60 und 61 gab es weder klinisch noch histologisch einen Hinweis auf Tumorentwicklung. Dies wurde durch die negativen Ergebnisse in allen getesteten Organen in der Southern-Blot-Hybridisierung bestätigt. Die mit HVMA infizierten und Cidofovir behandelten Tiere (Kaninchen 62-67) zeigten schon makroskopisch Organveränderungen (Tabelle 6), die alle histologisch als maligne Lymphome identifiziert wurden. Bei Kaninchen 62 konnte in der Milz ein malignes Non-Hogkin-Lymphom festgestellt werden, in den Nieren fanden sich ebenfalls Tumordinfiltrate. Die anderen Gewebe (Herz, Leber, Lunge) waren histologisch unauffällig. In der Southern-Blot-Hybridisierung waren bei diesem Tier alle getesteten Organe positiv. Die Signale bei Milz und Nieren waren deutlich intensiver als bei den anderen Geweben. Ähnliche Befunde ergab die Histologie bei Kaninchen 63, bei dem in der Milz, der Leber und der Niere große Infiltrate eines malignen Lymphoms festgestellt wurden. Kleinere Infiltrate fanden sich in der Haut, dem Fettgewebe und der Bauchmuskelfaszie. Alle diese Organe waren in der Southern-Blot-Hybridisierung stark positiv. Einzige Ausnahme bildete das Lungengewebe dieses Tieres, welches in der PCR und in der Southern-Blot-Hybridisierung negativ blieb. Bei ihm wurden mikroskopisch Tumorzellen nur im Arterienblut, nicht aber im Gewebe diagnostiziert.

Tumordinfiltrate konnten ebenfalls in Milz und Leber von Kaninchen 64 nachgewiesen werden. In der Southern-Blot-Hybridisierung waren diese Organe stark positiv. Weitere Tumordinfiltrate, die den Infiltraten der anderen Gewebe ähnelten, wurden in Darm, Zwerchfell und Fettgewebe gefunden. In der Lunge zeigte sich das Bild einer Bronchopneumonie und randständig kleinere Lymphom infiltrate. Diese Gewebe hatten in der Southern-Blot-Hybridisierung ebenfalls positive Ergebnisse. Signale mit schwächerer Intensität traten im Herz und in den Nieren auf, histologisch waren diese Organe aber tumorfrei. Auch bei Kaninchen 65 wurden in der Histologie Infiltrate eines Non-Hodgkin-Lymphoms in der Milz, den beiden Nieren und an der Kopfhaut gefunden. Diese Resultate wurden durch positive Werte in der Southern-Blot-Hybridisierung bestätigt. Obwohl das getestete Herz- und Lebergewebe dieses Tieres in der Southern-Blot-Hybridisierung schwache positive Signale zeigte, konnten histologisch keine Tumorzellen gefunden werden. Bei Kaninchen 66 waren in allen mikroskopisch untersuchten Geweben Tumordinfiltrate feststellbar, besonders stark waren Milz, Leber, Nieren und Fettgewebe betroffen. In der Southern-Blot-Hybridisierung fanden sich in allen Gewebeproben stark positive Ergebnisse. Große Tumordinfiltrate in Milz, Herz, Darm und in der Faszie des Bauchmuskels konnten in der histologischen Untersuchung der Gewebe von Kaninchen 67 festgestellt werden. Bei der anschließenden Southern-Blot-Hybridisierung zeigten sich in diesen Organen stark positive Signale. Kleine beginnende Infiltrationen, aber noch keine eindeutigen Tumordinfiltrate, wurden in der Lunge gefunden. Diese war in der Southern-Blot-Hybridisierung positiv. Die Nieren und die Leber waren histologisch tumorfrei, obwohl diese Organe in der Southern-Blot-Hybridisierung positive Resultate aufwiesen. Die Kaninchen 68, 70 und 71 hatten histologisch in allen Organen Infiltrate eines malignen Non-Hodgkin-Lymphoms, die Ergebnisse der Southern-Blot-Hybridisierung bestätigten dies durch Nachweis von Virus-DNA in allen untersuchten Proben.

In der mit Virus infizierten und PBS behandelten Versuchsgruppe (Kaninchen 68-72) fielen Kaninchen 69 und 72 dadurch auf, dass bei beiden keine makroskopischen Hinweise auf ein Tumorstadium feststellbar und auch die Organe histologisch tumorfrei waren. Bei Kaninchen 69 war die PCR in allen Organen negativ gewesen. Erst in der Southern-Blot-Hybridisierung konnten im Myokard und in der Milz schwach positive Resultate gefunden werden. Die ebenfalls getesteten Organe Lunge, Leber und Niere blieben auch in der Southern-Blot-Hybridisierung negativ. Bei Kaninchen 72 waren mit Ausnahme der Milz alle Gewebeproben in der PCR

negativ. Leber, linke Niere und Herz wiesen in der Southern-Blot-Hybridisierung schwach positive Signale auf, während rechte Niere und Lunge negativ blieben. Das Gewebe der Milz zeigte in der Southern-Blot-Hybridisierung ein deutlich positives Signal.

Auffällig ist, dass die Gewebeproben der Tiere ohne histologisch diagnostizierte Tumorentwicklung nur selten positive Signale in der Southern-Blot-Hybridisierung ergaben. Bei den getesteten Proben aus Herz, Milz und Niere waren die Signale in der Southern-Blot-Hybridisierung bei Positivität nur schwach. Die Tiere mit Tumorentwicklung waren in allen verwendeten Organproben in der Southern-Blot-Hybridisierung positiv, auch wenn sich histologisch in den Proben teilweise noch keine Infiltrate sicher feststellen ließen. Einzige Ausnahme stellte das Lungengewebe von Kaninchen 63 dar, welches in der Southern-Blot-Hybridisierung negativ war und auch histologisch keinen Anhalt für eine Tumorentwicklung gab. Insgesamt wurden 65 positive Signale in der Southern-Blot-Hybridisierung gefunden, histologisch aber nur 54 als Tumordinfiltrate bestätigt.

Tabelle 10: Ergebnisse der Untersuchungen von Kaninchengewebe mittels PCR und Southern-Blot-Hybridisierung

Kan.-Nr.	Virusinfektion/ Behandlung	Gewebe	PCR	Southern- Blot- Hybridisierung
62	Virusinfektion	Herz	+	++
		Leber	+	++
		Lunge	–	+
	Cidofovir	li. Niere	++	+++
		re. Niere	++	+++
		Milz	++	+++
63	Virusinfektion	Leber	+	+++
		Lunge	–	–
		Niere	+++	+++
	Cidofovir	Milz	++	+++
		Tumorinfiltrat Haut	+	+++
		Tumorinfiltrat Faszie	++	++
		Tumorinfiltrat Fettgewebe	++	++
64	Virusinfektion	Herz	+	+
		Leber	+++	+++
		Lunge	+	+
	Cidofovir	Niere	+	+
		Milz	+++	+++
		Tumorinfiltrat Fettgewebe	+++	+++
		Tumorinfiltrat Darm	+++	+++
		Tumorinfiltrat Zwerchfell	+++	+++
65	Virusinfektion	Herz	+	+
		Leber	+	+
		li. Niere	++	+++
	Cidofovir	re. Niere	+	+++
		Milz	+++	+++
		Tumorinfiltrat Kopfhaut	+++	+++
66	Virusinfektion	Herz	++	++
		Leber	+	+++
		Lunge	+	++
	Cidofovir	li. Niere	+	+++
		li. Niere	+++	+++
		re. Niere	+	+++
		Milz	+++	+++
		Tumorinfiltrat Fettgewebe	+++	+++
		Tumorinfiltrat Fettgewebe	+++	+++
		Tumorinfiltrat Fettgewebe	+	+++
		Tumorinfiltrat Faszie	+	+++
		Bauchmuskel		
		Tumorinfiltrat Haut	++	+++
		Tumorinfiltrat re. Kiefer	+	+++
67	Virusinfektion	Herz	++	++
		Leber	+	++
		Lunge	+	++
	Cidofovir	re. Niere	+	+
		li. Niere	+	+
		Milz	+++	+++
		Tumorinfiltrat Faszie	++	+++
		Tumorinfiltrat Darm	++	+++

Fortsetzung Tabelle 10:

Kan.- Nr.	Virusinfektion/ Behandlung	Gewebe	PCR	Southern- Blot- Hybridisierung
68	Virusinfektion	Herz	+	++
		Leber	+++	+++
		Lunge	++	+++
	PBS	li. Niere	+++	+++
		re. Niere	+++	+++
		Milz	+++	+++
69	Virusinfektion	Herz	-	+
		Herz	-	+
		Leber	-	-
	PBS	Lunge	-	-
		re. Niere	-	-
		Milz	-	+
70	Virusinfektion	Herz	++	+++
		Leber	+++	+++
		Lunge	+++	+++
	PBS	li. Niere	+++	+++
		re. Niere	+++	+++
		Milz	+++	+++
71	Virusinfektion	Herz	+	++
		Herz	+	+++
		Leber	++	++
	PBS	Lunge	+	+++
		Niere	+++	+++
		Milz	+	+++
72	Virusinfektion	Herz	-	+
		Leber	-	+
		Leber	-	+
	PBS	Lunge	-	-
		Lunge	-	-
		li. Niere	-	+
		re. Niere	-	-
		re. Niere	-	-
		Milz	+	++

- + schwaches Hybridisierungssignal
 ++ mäßig starkes Hybridisierungssignal
 +++ starkes Hybridisierungssignal
 - kein Hybridisierungssignal

- Bei den Tieren 59, 60 und 61 wurden Herz, Leber, Lunge und beide Nieren mit PCR und Southern-Blot-Hybridisierung untersucht, in keiner Probe konnte HVMA-DNA nachgewiesen werden.

6. Diskussion

EBV-assoziierte Erkrankungen können besonders bei immunsupprimierten Patienten einen schweren Verlauf nehmen und zu Lymphoproliferationen oder einer letal verlaufenden infektiösen Mononukleose führen (Kenagy et al., 1995; Bai et al., 1997; Boyle et al., 1997; Briz et al. 1997; Rowe et al., 1997; Hauke et al. 1998). Eine frühzeitige Diagnose der EBV-Infektion ist daher entscheidend für die Therapie und Prognose. Um die Letalität dieser Erkrankungen zu reduzieren, müssen vor allem die Erkenntnisse über die Frühphase der Infektion verbessert und die Entwicklung einer antiviralen Therapie vorangetrieben werden.

Zur Prüfung von in vitro gegen EBV wirksamen Substanzen ist es nötig, diese auch in einem Tiermodell zu untersuchen. Vor diesem Hintergrund wurde am Institut für Virologie und Antivirale Therapie schon 1991 ein Kaninchenmodell unter Verwendung des EBV-verwandten HVMA entwickelt. Die Infektion mit diesem Herpesvirus führt innerhalb von sechs Monaten bei nahezu 50% der Tiere zur Entwicklung von malignen Lymphomen, die histomorphologisch mit humanen Non-Hodgkin-Lymphomen hohen Malignitätsgrades vergleichbar sind. Die Immunkompetenz dieser Tiere unterscheidet sich von den meisten anderen in der Literatur beschriebenen Tiermodellen (Bosma et al., 1983; Cleary et al., 1985). Die nahe Verwandtschaft des HVMA zum humanen EBV ist durch folgende Daten wissenschaftlich belegt (Wutzler et al., 1995):

- Die Sequenzierung eines 457 bp Segmentes des Polymerasegens von HVMA ergab eine Sequenzhomologie von rund 94% zwischen beiden Viren.
- Primer aus dem BALF-5 Leserahmen für die Polymerase des EBV amplifizierten auch HVMA-DNA-Fragmente aus MAL-1 Zellen und aus Tumorgewebeproben der Tiere.
- In den MAL-1 Zellen waren Antigene wie VCA-gp125, VCA-p160, EA-R-p85 und EBNA-2 nachweisbar, die mit monoklonalen Antikörpern gegen das humane EBV reagierten.
- Antikörper, die von den Kaninchen im Verlauf der experimentellen Infektion gegen HVMA gebildet wurden, reagierten mit Strukturproteinen (p23/p18) und Nichtstrukturproteinen (p54/138) des humanen EBV.

Mit der vorliegenden Dissertation wurden Arbeiten, die am Institut für Virologie und Antivirale Therapie im Rahmen des VKF-Projektes „Prävention und Therapie EBV-assoziiierter lymphoproliferativer Erkrankungen durch selektive Virostatika und Impfstoffe in einem EBV-like (HVMA) Kaninchenmodell“ begonnen wurden, fortgeführt. Das wesentliche Anliegen dieser Untersuchungen war der Versuch, die infizierten Kaninchen mit Cidofovir zu therapieren.

Dieses Virostatikum wurde wegen seines breiten Wirkungsspektrums, das alle Herpesviren einschließlich EBV umfasst, ausgewählt (Lin et al., 1991a, 1991b; Neyts et al., 1991a, 1991b; De Clercq, 1993, 1996). Dazu zählen auch die humanen Herpesviren 6, 7, 8 und das murine Herpesvirus 68 (Kedes und Ganem, 1997; Medveczky et al., 1997; Neyts und De Clercq, 1997, 1998). Außerdem ist es wirksam gegen Adenoviren, Polyomaviren, Papillomaviren und Pockenviren (Nettleton et al., 2000; De Clercq et al., 2001, 2002a, 2002b; Smee et al., 2002).

Das azyklische Nukleosid-Phosphonat-Analogon Cidofovir (HPMPC= (S-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosin)) ist ein neues Nukleotidanalogen, das als falscher Baustein in die virale Nukleinsäure eingebaut wird und zum Kettenabbruch führt. Im Unterschied zu etablierten antiviralen Hemmstoffen wie beispielsweise Aciclovir, verfügt es bereits über eine Phosphatgruppe, so dass die Monophosphorylierung in der Zelle durch eine virale Thymidinkinase nicht mehr erforderlich ist. Das bedeutet, es wird unabhängig von viralen Enzymen zum Diphosphat umgesetzt und hemmt die virale DNA-Polymerase sowie die Neusynthese von viraler DNA.

Trotz der sehr guten Hemmwirkung auf das EBV in der Zellkultur hatte Cidofovir auf die experimentelle HVMA-Infektion keinen Einfluss. In den durchgeführten Kaninchen-Experimenten konnte die Tumorentstehung durch Cidofovir nicht verhindert werden. Alle infizierten und mit Cidofovir behandelten Kaninchen entwickelten maligne Non-Hodgkin-Lymphome. Dass der fehlende therapeutische Effekt auf eine mangelhafte antivirale Wirkung von Cidofovir in vivo zurückzuführen ist, kann auf Grund der in zahlreichen anderen Tiermodellen nachgewiesenen Wirksamkeit ausgeschlossen werden. In anderen Versuchen mit Kaninchen wurde die Effizienz von Cidofovir gegen durch Adenoviren und Herpes-simplex-Virus-Typ 1 ausgelöste Infektionen belegt (De Oliveira et al., 1996; Kaufmann et al., 1999; Romanowski et al., 1999, 2001; Romanowski und Gordon, 2000). In Versuchen mit immunsupprimierten BALB/c-Mäusen schützte eine Therapie mit Cidofovir bei einer

Dosis von 5 mg/kg pro Tag signifikant gegen eine Infektion mit dem murinen Herpesvirus 68 (Smee et al., 1997). Daraus wurde geschlossen, dass Cidofovir ein exzellenter Kandidat für die Behandlung von EBV-Infektionen beim Menschen sein könnte. Es wird auch von einer kompletten Regression von durch Papillomavirus induzierten Hautläsionen bei Kaninchen und Polyomavirus-induzierten Hämangiomen in Ratten nach Cidofovirgabe berichtet (Van Cutsem et al., 1995; Liekens et al., 1998).

Klinische Studien bestätigen ebenfalls die antivirale Wirksamkeit von Cidofovir. So wurde es erfolgreich bei der Behandlung der Adenovirus-Konjunktivitis und der Therapie von Hautläsionen durch Herpes-simplex-Virus-Typ 1 und 2 eingesetzt (Snoeck et al., 1994; Gordon et al., 1996). Bei Patienten mit Larynx-Papillomen und bei anderen durch Papilloma-Viren induzierten kutanen Läsionen führte es nach lokaler Anwendung zur Rückbildung der papulomatösen Veränderungen (Snoeck et al., 1995; Duan et al., 2000; Stragier et al., 2002). Cidofovir ist auch in der Lage, die Progression der Cytomegalievirus-Retinitis bei AIDS-Patienten zu verhindern (Lalezari et al., 1997). Für diese Indikation ist das Präparat weltweit zugelassen (De Clercq, 2003).

Der die Cidofovir-Therapie limitierende Faktor ist die Nephrotoxizität des Präparates. Sie beruht wahrscheinlich auf der Expression eines spezifischen Anionentransporters im proximalen Nierentubulus, der aber durch Gabe von Probenecid gehemmt werden kann (Lacy et al., 1998). Eine enge Überwachung der Nierenfunktion der Patienten ist dabei unverzichtbar, um das Therapierisiko zu minimieren (Lalezari et al., 1997). Pharmakokinetisch betrachtet, besitzt Cidofovir eine schwache Bindung an Plasma-Proteine und wird fast unverändert im Urin (>90% in 24 h) ausgeschieden. Die Wirkung im Körper hält viel länger an als seine Kinetik vermuten lässt, da der antivirale Effekt von der intrazellulären Konzentration der aktiv phosphorylierten Metaboliten in den Zellen abhängt. Diese Metabolite haben eine intrazelluläre Halbwertszeit von mehr als 48 Stunden (Cihlar et al., 1992; Ho et al., 1992). Das könnte der Grund für die verlängerte antivirale Wirkung von Cidofovir sein.

Um den Einfluss von Cidofovir auf die Virus-assoziierte Tumorentstehung im HVMA-Kaninchenmodell zu erkennen, wurde der Infektionsverlauf der behandelten und nicht behandelten Tiere über den gesamten Versuchszeitraum anhand von Laborparametern untersucht. Voraussetzung hierfür war die Etablierung der benötigten Methoden wie DNA-Extraktion, PCR und Gel-Elektrophorese. Deshalb

sollte zuerst zur Testung der Primer und zur Sensitivätsbestimmung der PCR die Viruskonzentration bei Patienten mit akuter EBV-Infektion ermittelt werden. Danach wurden die gewonnenen Erkenntnisse auf die Kaninchen übertragen.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb Serum von Patienten mit klinisch diagnostizierter (Fieber, Tonsillitis, Lymphadenopathie) und serologisch bestätigter infektiöser Mononukleose verwendet. Bei allen positiven PCR-Proben wurde im Anschluss durch eine quantitative PCR die EBV-Konzentration pro ml Serum bestimmt. Von den 49 untersuchten Proben waren 27 in der qualitativen PCR positiv, das entspricht rund 55%. Der Nachweis freier Viren- bzw. Virus-DNA im Serum bzw. Plasma ist ein aussagekräftiger Beweis für eine Virämie. In der Literatur werden in diesem Zusammenhang verschiedene Werte genannt. So sprechen Fontan et al. (1998) von 85,5% positiven Serum-Proben, Yamamoto et al. (1995) geben sogar 100% an. Beide beziehen sich allerdings auf die akute Phase der Erkrankung. In der rekonvaleszenten Phase wird die Serumpositivität nur noch mit 44% angegeben (Yamamoto et al., 1995). Für die Anzahl der EBV-Genom-Kopien pro ml Serum lassen sich ebenfalls verschiedene Werte finden. So konnten im Plasma von Patienten mit infektiöser Mononukleose 1000 bis 16000 Virus-Genom-Kopien pro ml nachgewiesen werden. Ähnliche Werte fanden sich bei den quantitativ untersuchten 27 Patienten der vorliegenden Arbeit, die zwischen 500 und 8000 Virus-Genom-Kopien pro ml Serum aufwiesen. Die relativ große Differenz zwischen den einzelnen Werten kann darauf zurückzuführen sein, dass es sich bei den untersuchten Proben sowohl um Patienten in der akuten Phase der Erkrankung (hohe Kopienwerte) als auch um Patienten in der rekonvaleszenten Phase (niedrige Kopienwerte) gehandelt haben kann. In verschiedenen Studien wird beschrieben, dass das Absinken der EBV-Genom-Kopien für eine Verbesserung der klinischen Symptomatik spricht (Yamamoto et al., 1995; Meerbach et al., 2001). Somit korreliert die Aktivität des Virus mit der Höhe der Virus-Genom-Kopien im Blut und verläuft parallel zum Krankheitsprozess.

Zur Erfassung der virologischen Parameter bei den Kaninchen war es erforderlich, aus den wöchentlich gewonnenen Plasma- und Leukozyten-Proben DNA zu extrahieren und mittels PCR und nested-PCR genauer zu untersuchen. Die Ergebnisse der PCR und die im Anschluss daran errechnete Anzahl der Virus-Genom-Kopien gaben über den Verlauf der Erkrankung auf molekularer Ebene Aufschluss. Die verwendete qualitative und semiquantitative PCR erwies sich als

äußerst empfindliche und somit geeignete Methode zum Nachweis des EBV/HVMA-Genoms und zur Bestimmung der Virusmenge. Aufgrund der von Wutzler et al. (1995) festgestellten Sequenzhomologie von 94,8% zwischen dem HVMA- und dem EBV-Polymerasegen lassen sich die pol-Primer auch zum Nachweis von HVMA verwenden. Vor der Durchführung der quantitativen PCR wurde die Sensitivität der pol-PCR mit der der p23-PCR, die bei den Patienten mit akuter EBV-Infektion eingesetzt wurde, verglichen. Die Verdünnungsreihen waren in der Auswertung der pol-PCR ebenso wie bei der p23-PCR bis 10 pg Namalwa-DNA positiv. Dies entspricht ca. 10 Virus-Genom-Kopien (Meerbach et al., 2001). Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität der pol-PCR genauso präzise ist wie eine PCR mit p23-Primern. Dies war die Voraussetzung zur genauen Berechnung der Anzahl der Virus-Genom-Kopien. Als Primer für den HVMA-Nachweis wurden die Oligonukleotide pol-1 und pol-2 (Schätzl et al., 1993) sowie für die nested-PCR die Primer pol-3 und pol-4 (Wutzler et al., 1995) verwendet, die ein Fragment aus der HVMA-DNA-Polymerase-Region amplifizieren. Auch beim HVMA-Nachweis im Plasma, den Leukozyten und dem Gewebe der Kaninchen wurden Standardverdünnungsreihen mitgeführt, die ebenfalls zur Quantifizierung der Viruslast dienten. Bei der Auswertung der Anzahl der Virus-Genom-Kopien muss beachtet werden, dass die Verdünnungsreihen logarithmisch aufgebaut sind. Dadurch sind auch die relativ großen Schwankungen zwischen den einzelnen Stufen einer Verdünnungsreihe zu erklären. Zum Beispiel erhöht sich die Anzahl der Virus-Genom-Kopien von einer Stufe zur nächst höheren bei einer Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2 um das doppelte. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass oft nur eine geringe Menge an Kaninchenblut (ca. 0,5-1 ml) und dadurch auch nur eine relativ geringe Menge an DNA, oft weniger als 1 µg, zur Verfügung stand. Deshalb erscheint es sinnvoller, nicht die gemessenen absoluten Werte, sondern den Verlauf der Infektion für jedes einzelne Tier unter Berücksichtigung des logarithmischen Aufbaus der Verdünnungsreihe zu beurteilen.

Auffällig ist, dass alle Kaninchen unabhängig von ihrer Behandlung oder einer späteren Tumorentwicklung schon in der 2. Woche p.i. einen deutlichen Anstieg der Virus-Genom-Kopien aufwiesen und in der folgenden Woche die höchsten Werte gemessen wurden. Dieser Verlauf unterstreicht die Ergebnisse der qualitativen PCR mit Plasma und Leukozyten-DNA und zeigt die Wichtigkeit der frühen Infektionsphase für den weiteren Krankheitsverlauf. Denn die Tiere ohne

Tumorentwicklung zeigten in den folgenden Wochen abfallende Virus-Genom-Kopien, die oft unter der Nachweisgrenze von 50 Virus-Genom-Kopien pro 10^5 Leukozyten lagen. Dies spricht für eine Kontrolle der Virusinfektion durch das Immunsystem der Kaninchen. Die Tiere mit Tumorentwicklung zeigten dagegen einen konstant hohen Level an Virus-Genom-Kopien und verstarben häufig vor dem Ende der Versuche. Bei einem Versuchstier konnten, nachdem zuvor nur niedrige Werte von 50 Virus-Genom-Kopien gefunden wurden, erst in den letzten beiden Versuchswochen mit rund 25.000 Virus-Genom-Kopien hohe Werte gemessen werden. Da das Tier sich auch klinisch unauffällig verhielt, histologisch aber ein Tumor diagnostiziert wurde, muss in diesem Fall der späte Anstieg der Viruskonzentration als ein Signal für eine im Vergleich zu den anderen Tieren verspätet einsetzende Tumorgenese gewertet werden.

Die Messung der Viruskonzentration mittels quantitativer PCR erwies sich in den durchgeführten Versuchen als sensitiver Marker für das Auftreten von malignen Tumoren. Der kontinuierliche Nachweis von mehr als 1000 Virus-Genom-Kopien im Kaninchenblut kann deshalb als kritischer Wert für die Tumorentstehung gewertet werden, währenddessen der Abfall der Virus-Genom-Kopien unter 1000 als prognostisch günstig einzustufen ist und für eine Kontrolle der Virusinfektion spricht. Die Kontrolle der Infektion und damit des Tumorwachstums war jedoch entgegen den Erwartungen unabhängig von der Cidofovirgabe.

Mit Hilfe der verwendeten PCR konnte gezeigt werden, dass in allen mit HVMA infizierten Kaninchen eine aktive Infektion stattgefunden hat. Hinweise für eine vorzeitige Eliminierung des Virus durch das Immunsystem der Versuchstiere konnten nicht festgestellt werden. Die nicht mit Virus infizierten Kaninchen zeigten in der PCR über den gesamten Versuchszeitraum negative Ergebnisse. In der nach Abschluss der Versuche durchgeführten Southern-Blot-Hybridisierung mit Gewebeproben dieser Tiere wurde ebenfalls keine Virus-DNA detektiert, so dass sowohl eine endogene als auch eine horizontale Infektion ausgeschlossen werden kann. Das spricht für die optimale Haltung der infizierten Kaninchen, die eine Übertragung der Viren innerhalb der Tierräume verhinderte. Bei den nicht infizierten und mit Cidofovir behandelten Tieren konnte keine gravierenden Arzneimittel Nebenwirkungen festgestellt werden, denn der Allgemeinzustand der Kaninchen war bis zum Versuchende in der 24. Woche unauffällig. Interessant ist, dass in den ersten drei Wochen der Infektionsverlauf unabhängig von einer PBS- oder Cidofovirbehandlung

wie einer späteren Tumorentwicklung relativ identisch war. So konnten bei allen mit HVMA infizierten Tieren positive PCR-Resultate in den Leukozyten schon in der 2. Woche p.i. festgestellt werden, während dies im Plasma erst eine Woche später der Fall war. Der Nachweis von Virus im Plasma, der beweisend für eine Virämie ist, lässt vermuten, dass es bei allen Tieren nach der Primärinfektion zur lytischen Phase der Virusreplikation in den Leukozyten und damit zur Freisetzung von Viren ins Plasma kam. In den folgenden Versuchswochen waren sowohl eine Virämie als auch kontinuierlich HVMA-positive Leukozyten bei allen Tieren mit späterer Tumorentwicklung, ein Kaninchen ausgenommen, nachweisbar. Unterschiede zwischen der Cidofovir- und der Placebogruppe bestanden nicht. Diese Ergebnisse bestätigen die klinische Beobachtung dahingehend, dass Cidofovir entgegen den Erwartungen ein Fortschreiten der Infektion nicht verhindern konnte. Obwohl es *in vitro* die Virus-DNA-Synthese deutlich zu reduzieren vermag, hatte Cidofovir ebenso wenig Einfluss auf die gemessenen virologischen Parameter in der Frühphase der Infektion.

Eine Ursache für die Unwirksamkeit von Cidofovir bei der Tumorentstehung in den Kaninchen könnte darin liegen, dass das Virostatikum keinen Einfluss auf die episomale Form der EBV-DNA hat (Lin et al., 1991a, 1991b). Dadurch ist auch unter der Einwirkung des Virostatikums eine bestimmte Anzahl von Virus-Genom-Kopien in den nicht Virus-replizierenden Zelllinien vorhanden. Die latenten Genome werden von der zellulären DNA-Polymerase repliziert (Lin et al., 1991a, 1991b). Dass in der kurzen Phase zwischen Infektion und Therapiebeginn eine Eliminierung des Virus nicht mehr möglich war, lässt sich mit einer unmittelbar nach der Infektion erfolgten Transformation der Lymphozyten erklären. Anhaltspunkte dafür, wann eine solche Transformation stattfindet, liefern Untersuchungen von Meerbach et al. (2004). Die Autoren berichten, dass Kaninchen-Lymphozyten, die *in vitro* mit HVMA infiziert werden, innerhalb von zehn Tagen stark proliferieren, was für eine Zelltransformation spricht. In diesen Zellen konnte ein EBNA-ähnliches HVMA-Kernantigen nachgewiesen werden.

Bei den Kaninchen wurde zwischen der 2. und 4. Versuchswoche eine deutlich höhere Anzahl von Virus-Genom-Kopien in den Leukozyten gemessen als in den folgenden Wochen. Das spricht für die in der Initialphase der Infektion besonders hohe Replikationsrate des Virus (siehe Ergebnisse: 5.2.4. / Abb. 6.1 – 6.11). Auch im späteren Versuchsverlauf war kein Unterschied zwischen den mit Cidofovir und den

mit PBS behandelten Tieren feststellbar. Im Plasma und in den Leukozyten waren acht der elf Tiere durchgehend positiv. Nur zwei Kaninchen hatten, von kurzzeitigen virämischen Phasen abgesehen, keine Virämie. Bemerkenswert ist, dass diese beiden Tiere bis zum Versuchsende tumorfrei blieben, obwohl die Leukozyten meist HVMA-positiv waren. Sie waren offenbar in der Lage, die Infektion zumindest teilweise zu kontrollieren, so dass es nur selten zur Freisetzung von Viruspartikeln ins Plasma kam. Bei einem Kaninchen, bei dem ein Tumor erst während der Sektion diagnostiziert wurde, kam es im Plasma erst in der 22. und 23. Woche p.i. zu einer Virämie. Die Virus-Genom-Kopien stiegen während dieser Zeit in den Leukozyten in einem hohen Maß von zwei bis drei Zehnerpotenzen an. Da es klinisch bis zu diesem Zeitpunkt unauffällig war, könnte dies als Hinweis auf eine im Vergleich zu den anderen Tieren verspätet einsetzende Tumorentwicklung zu werten sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der wesentliche Unterschied zwischen den Tieren mit und ohne Tumor das Auftreten einer Virämie war. Die Tiere mit Tumorbildung waren im Plasma in der Regel HVMA-positiv. Im Gegensatz dazu konnte dort bei den Kaninchen ohne Tumorbildung nur selten Virus-DNA nachgewiesen werden.

Die Leukozyten der Tiere, bei denen sich im Versuchsverlauf kein malignes Lymphom entwickelte, ergaben abhängig von der Versuchswoche sowohl positive als auch negative PCR-Resultate. Der entscheidende Unterschied zwischen den Tieren mit und ohne Tumor lag in der gemessenen Virusmenge. Denn Versuchstiere mit malignem Tumor hatten eine deutlich höhere Anzahl an Virus-Genom-Kopien in den Leukozyten als die Tiere ohne malignen Tumor. Dafür spricht, dass diese Tiere aufgrund ihrer besseren Virusinfektionskontrolle eine geringere Viruslast in den Leukozyten aufwiesen und deshalb keinen malignen Tumor entwickelten. Es kann somit festgestellt werden, dass konstant niedrige Kopienzahlen von unter 1000 Virus-Genom-Kopien pro 10^5 Zellen eng mit der Kontrolle der Virusinfektion und der Verhinderung der Tumorgenese korrelieren. Ansteigende und kontinuierlich hohe Werte über 1000 Virus-Genom-Kopien pro 10^5 Zellen sind als Hinweis auf eine aktive Virusinfektion mit Gefahr einer Tumorbildung zu werten und haben prognostische Bedeutung.

Es stellt sich die Frage, warum einzelne Tiere aus der Kontrollgruppe ohne Cidofovir-Behandlung keine Tumore entwickelten, während es bei allen Kaninchen in der Cidofovirgruppe zur Tumorbildung kam. Bezogen auf die Gesamtmenge der mit

HVMA infizierten Versuchstiere lag die Tumorrates bei 82%. Das bedeutet, dass neun von elf Versuchstieren ein malignes Non-Hodgkin-Lymphom entwickelten. In früheren Versuchsreihen der Arbeitsgruppe, die unter vergleichbaren Versuchsbedingungen durchgeführt wurden, betrug die Tumorrates nur rund 53% (Wutzler et al., 1995). Allerdings waren die Tiere der ersten Versuchsreihen älter als die in den vorliegenden Experimenten. Somit kann angenommen werden, dass ältere Tiere die Infektion besser kontrollieren können als jüngere. In Forschungsgruppen, die mit anderen EBV-verwandten tierischen Viren arbeiteten, konnten ebenfalls nicht bei allen Versuchstieren Tumore induziert werden. Die Tumorrates lag zwischen 40% und 90% (Hayashi et al., 1994, 1995, 1999; Ohara et al., 1993; Pingel et al., 1997).

Dass die Ergebnisse der Tierversuche nicht nur vom Alter und der Immunkompetenz der Tiere, sondern auch von den verwendeten EBV-verwandten Viren und der Applikationsart abhängen, zeigen weitere wissenschaftliche Untersuchungen. Sowohl nach intravenöser Injektion von HTLV-II-transformierten Affen (*Cynomolgus*)-Leukozyten als auch zellfreier Pellets derselben Leukozytenzelllinie kam es bei 10 von 13 Kaninchen innerhalb von 15 bis 28 Tagen zur Entwicklung maligner Lymphome. Die Tumore waren mehrheitlich in soliden Organen wie der Milz, der Leber und in den Nieren zu finden und wurden als Non-Hodgkin-Lymphome klassifiziert. Diese Versuche verdeutlichten, dass die Malignome durch ein neuartiges Virus aus den Si-IIA-Zellen hervorgerufen wurden und nicht durch HTLV selbst. Denn obwohl HTLV *in vitro* Kaninchen-Leukozyten transformieren kann, entwickelten die nur mit HTLV infizierten Tiere keine Lymphome (Miyamoto et al., 1990a, 1990b). Durch Analyse von PCR-Produkten konnte festgestellt werden, dass das von den Si-IIA-Zellen produzierte Herpesvirus zu 82% homolog zum humanen EBV ist (Ino et al., 1997). Vorteil dieses Kaninchenmodells ist die wesentlich höhere Rate an induzierten Lymphomen im Vergleich zu anderen Tiermodellen (Miller et al., 1977) und der Verzicht von Immunsuppressiva (Hayashi et al., 1995).

In weiteren Versuchen mit cyno-EBV-produzierenden Affen-Lymphozyten der Zelllinie Ts-B6 entwickelten 90% der Kaninchen, die intravenös mit dem Virus infiziert wurden, ein Lymphom, während die oral infizierten Tiere nur zu 20% Lymphome bildeten. Auch diese Tumore waren in den soliden Organen der Versuchstiere lokalisiert. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Ts-B6 Zellen sowohl EBER-ähnliche Transkripte als auch EBNA-1-verwandte Antigene exprimierten. Im Gegensatz dazu konnten keine Lymphome in Kaninchen nach Injektion von B95-8

(EBV-produzierende Zelllinie) gefunden werden. Das ist auf das enge Wirtsspektrum des humanen EBV, welches auf den Menschen und einige Neuweltprimaten beschränkt ist, zurückzuführen.

EBNA-1 ist ein wichtiges Protein für die Immortalisation und die Tumorgenese von infizierten Zellen. Da die genaue Funktion verschiedener Varianten von EBNA-1 ungeklärt ist, diese aber wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Tumorgenese spielen, wurden die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen dieses Kernantigens zwischen EBV, cyno-EBV und anderen Lymphocryptoviren verglichen. Die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von EBNA-1 der mit cyno-EBV infizierten Zelllinien Si-IIA und Ts-B6 waren zu rund 50–58% homolog zu den EBNA-1-Sequenzen von EBV und anderen Lymphocryptoviren. Die Sequenzanalysen bieten eine wichtige Grundlage für weitere Studien mit diesen Tiermodellen im Vergleich zum humanen EBV und anderen Viren dieser Gattung (Ohara et al., 2000).

Wie zuvor beschrieben, können die genannten Untersuchungen untereinander nur schlecht verglichen werden. Aber gemeinsam ist allen Arbeiten, dass zum einem im Tumorgewebe selbst das Virus nachgewiesen werden konnte und zum anderen virale Proteine wie EBNA oder EBER detektiert wurden, die für die Immortalisation und Tumorgenese mit verantwortlich sind. Interessanterweise stellte Hayashi et al. (1999) in den induzierten Tumoren Chromosomentranslokationen bei 12q oder 12t (7p+:12q-) fest. Chromosomenabnormalitäten mit einem hypotetraploiden Chromosomensatz konnten auch in den Kaninchen-Lymphozyten festgestellt werden, die in vitro mit HVMA transformiert wurden (Meerbach et al., 2004). Es ist bekannt, dass durch Chromosomenveränderungen Protooncogene aktiviert werden können, die die Tumorentwicklung fördern. Für die Entstehung des Burkitt-Lymphoms sind solche Translokationen nach Infektion mit EBV als entscheidender Faktor der Pathogenese beschrieben (Magrath et al., 1992; Joab, 1999; Zimonjic et al., 2001).

Die vorliegende Arbeit belegt, dass die B-Zellproliferation und Tumorentstehung bei den Kaninchen im Zusammenhang mit der HVMA-Infektion steht. Auf welche Weise die Virusinfektion in die Regulation des Zellwachstums eingreift, ist jedoch nicht bekannt. Man kann davon ausgehen, dass sich das HVMA ähnlich wie EBV verhält, d.h. dass das Virus nach der Primärinfektion latent in den B-Lymphozyten persistiert. Nach Angaben von Humme et al. (2003) werden rund 50% der latent durch EBV infizierten Zellen immortalisiert. Das bedeutet, die Zellen können dauerhaft in Kultur

gehalten werden, ohne dass die Anzahl der Zellteilungen begrenzt wäre. Diese Eigenschaft bildet die Grundlage für die Entstehung lymphoproliferativer Erkrankungen (Cesarman, 2002). Wahrscheinlich ist ein geschwächtes Immunsystem nicht in der Lage, infizierte B-Lymphozyten in ausreichender Menge zu eliminieren. Die anhaltende Expression von transformierenden Proteinen führt so zur Transformation und Expansion der EBV-tragenden Lymphozyten. Die entstehenden Lymphome sind initial polyklonal, wie durch Immunglobulinrearrangements festgestellt wurde (Hanto et al., 1982). Nach einiger Zeit setzt sich der Klon mit der höchsten Proliferationsrate durch und führt zur Monoklonalisierung des Lymphoms. Histologisch finden sich meist Riesenzelllymphome, seltener kleinzellige Lymphome oder Hodgkintumore. Der Körper ist meistens in der Lage, bei gutem Immunstatus die polyklonalen Tumore zu besiegen. Übertragen auf das Kaninchenmodell würde dies bedeuten, dass die Bestimmung der Klonalität der induzierten Tumore Ziel weiterführender Experimente sein sollte.

Was das methodische Vorgehen betrifft, erfolgte die Untersuchung der Gewebeproben der Kaninchen zuerst mit der PCR. Anschließend wurden Proben, die nur schwach positive Befunde ergeben hatten, mittels Southern-Blot-Hybridisierung untersucht, um eine höhere Sensitivität zu erreichen. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist ihre höhere Spezifität, die durch die spezifische Bindung der DNA-Sonden an die komplementären Nukleotidsequenzen der Amplifikate erreicht wird. Prinzipiell wäre für den Nachweis der Virus-DNA im Gewebe auch die In-Situ-Hybridisierung, die es ermöglicht, die virale Nukleinsäure direkt in den infizierten Zellen darzustellen, geeignet gewesen. Diese Methode hat sich bei der EBV-Diagnostik bewährt und gilt als außerordentlich empfindlich, wenn damit bestimmte Ribonukleinsäuren (EBER) nachgewiesen werden, die in den latent mit EBV infizierten Zellen in hoher Anzahl vorhanden sind. Mit dem HVMA ist dies nicht gelungen, da die entsprechenden DNA-Sequenzen nicht bekannt sind und die Sequenzhomologie mit dem EBV in diesem Genombereich offenbar nicht ausreichend hoch ist, um EBV-Sonden verwenden zu können.

In allen untersuchten Geweben der Tiere mit Tumorentwicklung, mit Ausnahme der Lunge von Kaninchen 63, konnte HVMA-DNA nachgewiesen werden. Das Lungengewebe zeigte nur schwach positive Ergebnisse. Im Gegensatz zu anderen Organen wurden in den Lungen auch histologisch nur vereinzelt Tumorzellen gefunden, dafür aber immer Tumorzellen in den Gefäßen des Organs. Diese haben

wahrscheinlich die schwach positiven Signale verursacht. Die Tumore waren ausschließlich maligne Non-Hogkin-Lymphome, die meistens in Milz, Nieren, Leber und Herz lokalisiert waren, in einigen Fällen aber auch im Fettgewebe, in der Haut und in Muskelfaszien gefunden wurden. Die japanische Arbeitsgruppe von Hayashi beschreibt ebenfalls die soliden Organe als Hauptmanifestationsort der Lymphome (Hayashi et al., 1997, 1999). Der Zusammenhang zwischen der Virusinfektion und der Tumorentwicklung wird auch dadurch deutlich, dass in den Gewebeproben der Tiere ohne Tumorbildung entweder keine oder nur geringe Mengen an Virus-DNA nachgewiesen wurden. Diese schwach positiven Resultate sind wahrscheinlich auf Blutbeimengungen im untersuchten Gewebe zurückzuführen.

Aus den beschriebenen Untersuchungen lässt sich schlussfolgern, dass die Aktivität des Virus mit der Höhe der Virus-Genom-Kopien in den Leukozyten korreliert und parallel zum Krankheitsprozess verläuft. Die Plasma-Proben der Kaninchen waren überwiegend HVMA positiv, dies unterstreicht die Aktivität der Infektion. Cidofovir als alleinige Therapie konnte die Tumorentstehung nicht verhindern und hatte auch keinen nennenswerten Einfluss auf die Infektionsparameter. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich darin zu sehen, dass Cidofovir, wie alle bisher getesteten antiviralen Hemmstoffe, nur die lytische Infektion (Virusproduktion) hemmt, während die latente Infektion oder Zellimmortalisation (Replikation der Episome) unbeeinflusst bleibt (Colby et al., 1982). Die Senkung der Viruslast in der lytischen Phase führt aber kaum zu einer klinisch messbaren Verbesserung der Krankheitssymptomatik bei Patienten und hat auch keinen nachgewiesenen Einfluss auf die Tumorentwicklung (Andersson et al., 1987; Gratama et al., 1988). Diese Ergebnisse werden durch die Untersuchungen von Torre und Tambini (1999) untermauert. Auch eine Kombinationstherapie von Aciclovir und Interferon- γ erwies sich als erfolglos (Meier et al., 1992). Ein weiterer Grund für die begrenzte Wirkungsdauer der bisher verwendeten antiviralen Medikamente ist die EBV-Polymerase. Sie kann durch eine assoziierte Exonuclease das terminal inkorporierte Triphosphat ausschneiden und führt dadurch zu einem Wirkungsverlust der Virustatika (Clough, 1980; Feighny et al., 1980; Chen et al., 1990; Baylis et al., 1991; Tsurumi et al., 1993a, 1993b; Tsurumi und Nishiyama 1994).

In neuen Studien konnte der Verlauf der PTLD durch Gabe von monoklonalen Antikörpern gegen B-Lymphozyten wie anti-CD20, 21 und 24 positiv beeinflusst werden (Kuehnle et al., 2000). Außerdem wurde ein Ansprechen auf die

Verabreichung von EBV-spezifischen zytotoxischen Spender-T-Lymphozyten und die Behandlung von Knochenmarksempfängern mit nicht bestrahlten Spenderleukozyten beschrieben (Papadopoulus et al., 1994; Heslop et al., 1996; Rooney et al., 1998a,b,c; Rooney und Brenner, 1998; Bollard et al., 2000; Kuehnle et al., 2000). Die Gabe des monoklonalen Antikörpers Rituximab, der gegen CD20-Oberflächenmarker auf den B-Zellen wirkt, konnte ebenfalls Erfolge erzielen (McGuirk et al., 1999; Carpenter et al., 2000). Problematisch ist, dass die anti-CD20-Therapie zur Selektion von CD20-negativen proliferierenden B-Zellen führt (Davis et al., 1999). Bis heute existiert kein Medikament, welches einen nachgewiesenen Einfluss auf die latente EBV-Infektion ausübt. Deshalb sind neue Strategien in der antiviralen Therapie notwendig, um die Therapiechancen der steigenden Patientenzahl zu erhöhen.

Als neue Therapieansätze werden zum Beispiel antisense-Oligonukleotide gegen EBNA-1 oder BZLF-1 beschrieben, die als Angriffspunkt die Replikation der Episome haben (Pagano et al., 1992; Daibata et al., 1994). Die Verhinderung des Wachstums von EBV-immortalisierten Zellen durch Interferon- α und Immunglobulin- γ oder die Blockierung der mRNA für EBNA-1 stellen weitere Möglichkeiten der antiviralen Therapie dar (Shapiro et al., 1988; Lin et al., 1989; Pagano et al., 1992; Noguchi et al., 2001). Da EBV bestimmte Promotorregionen der DNA methyliert, könnte die Gabe von demethylierenden Substanzen eine weitere Therapiestrategie sein. Durch die Demethylierung soll so die Transkription viraler Proteine reaktiviert werden. Das hätte zur Folge, dass die Virus-infizierte Zelle vom Immunsystem erkannt und eliminiert wird (Tao und Robertson, 2003). Auch die Gentherapie eröffnet neue Möglichkeiten in der Behandlung, beispielsweise durch direkte Unterbrechung der Funktion bestimmter EBV-Gene (Murray und Young, 2001).

Außerdem soll die Reduktion der Immunsuppression in Kombination mit Virustatika zum einen und enges Monitoring mit Bestimmung der Viruslast in den mononukleären Zellen des Blutes zum anderen das Auftreten einer PTLD verhindern oder zumindest frühzeitig anzeigen (Savoie et al., 1994; Rooney et al., 1995a, 1995b; Rooney et al., 1998a, 1998b, 1998c; Fontan et al., 1998; Srivastava et al., 1999). In der Literatur finden sich unterschiedliche Absolutwerte, die das Auftreten einer PTLD bei Patienten signalisieren sollen. Rooney et al. (1995a, 1995b) postuliert, dass ein Anstieg der Virus-Genom-Kopien auf Werte zwischen 200 und 200.000 als kritisch, ein Abfall unter 200 dagegen als prognostisch günstig einzustufen ist. Lucas et al. (1998) zieht die Grenze bei 400 bis 400.000 Virus-

Genom-Kopien, während in anderen Arbeiten noch 5000 Virus-Genom-Kopien pro μg DNA als unkritisch angegeben werden (Maeda et al., 1999a, 1999b). In weiteren Studien wurden bis zu 200.000 EBV Kopien pro ml gemessen, ohne dass eine PTLD auftrat (Van Esser et al., 2001).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete quantitative PCR zur Berechnung der Virus-Genom-Kopien in den Leukozyten korreliert eng mit der klinischen Symptomatik der Versuchstiere. Durch die wöchentliche Blutuntersuchung konnte überblicksartig die Aktivität der Virusinfektion im Versuchverlauf dargestellt werden. Ein zukünftiger Einsatz der quantitativen EBV-PCR mit der Bestimmung der Virus-Genom-Kopien im Sinne eines Tumormarkers scheint sinnvoll, da sich die Virusmenge im Blut annähernd parallel zum Krankheitsverlauf beziehungsweise der Aktivität des Krankheitsprozesses verhält. So ist eine hohe Anzahl an Virus-Genom-Kopien in den Leukozyten der Kaninchen mit malignem Tumor bei gleichzeitiger nachgewiesener Positivität (Virämie) im Plasma analog zu den Befunden bei Patienten mit EBV-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen. Außerdem fällt auf, dass die Konzentration der Virus-Genom-Kopien in den peripheren mononukleären Zellen schon vor dem Auftreten klinischer Symptome ansteigt, während zu diesem Zeitpunkt im Plasma noch keine Virämie nachweisbar ist (Rooney et al., 1995a, 1995b; Wagner et al., 2002). Teilweise waren bei den Tieren mit Tumorbildung mehr als 100.000 Virus-Genom-Kopien pro 10^5 Zellen messbar. Ähnlich hohe Werte wurden auch bei Patienten mit einer PTLD beschrieben und sind deshalb ein wichtiger Parameter der Virusaktivität - der Tumorentwicklung. (Lucas et al., 1998). Bei diesen Patienten konnte auch gezeigt werden, dass bei erfolgreicher Therapie die Anzahl der EBV-Genom-Kopien drastisch absinkt (Rooney et al., 1995a, 1995b; Smets und Sokal, 2002; Smets et al., 2002).

Um die Effektivität neuer Therapiemethoden zu erhöhen, ist es unverzichtbar, mit Hilfe der Bestimmung der Virusaktivität die Diagnostik einer PTLD zu verbessern. Die auf diesem Wege identifizierten Patienten können so schnell einer Therapie zugeführt werden. Aufgrund der hohen Mortalitätsrate dieser Krankheit ist dies von immenser Wichtigkeit (Rooney et al., 1998a, 1998b, 1998c). Zurzeit scheint es sinnvoll zu sein, eine preemptive Therapie als Behandlung zu empfehlen (Wagner et al., 2001a, 2001b, 2001c). So konnten Gruhn et al. (2003) durch Behandlung mit Rituximab und Cidofovir bei drei Patienten mit hohen EBV-Genom-Kopien in Leukozyten und Plasma die Bildung einer EBV-assoziierten PTLD verhindern.

7. Schlussfolgerungen

- Die Infektion mit einem Herpesvirus von Makaken (Herpesvirus Macaca arctoides, HVMA), das eng mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) verwandt ist, führte innerhalb von sechs Monaten bei Kaninchen zu malignen Lymphomen, die histomorphologisch mit menschlichen Non-Hodgkin-Lymphomen hohen Malignitätsgrades vergleichbar sind.
- Die Tumore waren mehrheitlich in den soliden Organen Milz, Niere, Leber und Herz lokalisiert, teilweise wurden auch Tumorinfiltrate in Haut, Lunge, Darm und Fettgewebe festgestellt.
- Mit diesem Kaninchenmodell können reproduzierbar maligne Tumore erzeugt und antivirale Wirkstoffe getestet werden. Cidofovir, ein neues Virustatikum mit breitem antiviralen Wirkungsspektrum, hatte in der verwendeten Dosierung und Applikationsart (i.v.) keinen Einfluss auf die Frühphase der Infektion und die Entwicklung maligner Tumore.
- Dass durch Cidofovir in der kurzen Phase zwischen Infektion und Therapiebeginn eine Eliminierung des Virus nicht möglich war, lässt sich mit einer unmittelbar nach der Infektion erfolgten Transformation der Lymphozyten erklären. Da die episomale Form der viralen DNA in transformierten Zellen nicht durch Virustatika zu beeinflussen ist, konnte der Prozess der malignen Lymphoproliferation nicht gestoppt werden.
- Bei Untersuchungen der Frühphase der HVMA-Infektion und der Tumorentwicklung erwies sich die verwendete qualitative und quantitative PCR mit Primern aus der Polymerasegenregion des EBV als zuverlässige und sensitive Methode zur molekularbiologischen Bestimmung des Infektionsverlaufs.
- Die mit HVMA infizierten Kaninchen wiesen unabhängig von der antiviralen Behandlung und einer späteren Tumorentwicklung bereits in der zweiten Woche p.i. einen deutlichen Anstieg der Virus-Genom-Kopien auf, der in der folgenden

Woche die höchsten Werte erreichte. Dieser Infektionsverlauf unterstreicht die Bedeutung der frühen Infektionsphase für den weiteren Krankheitsverlauf.

- Gleichbleibend niedrige Kopienzahlen von unter 1000 Virus-Genom-Kopien pro 10^5 Zellen korrelierten eng mit der Kontrolle der Virusinfektion und der Verhinderung der Tumorgenese. Ansteigende oder kontinuierlich hohe Werte über 1000 Virus-Genom-Kopien pro 10^5 Zellen sind als Hinweis auf eine aktive Virusinfektion mit Gefahr einer Tumorbildung zu werten und haben prognostische Bedeutung.
- Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Kaninchen mit und ohne Tumor war das Vorliegen einer Virämie, d.h. der Nachweis freier HVMA-DNA im Plasma bei den Tieren mit Tumorbildung.
- Bei Kaninchen mit Tumorentwicklung wurde in den untersuchten Organen eine hohe Viruskonzentration gefunden, während bei den Tieren ohne Tumorbildung kein Virus oder nur eine geringe Viruskonzentration nachweisbar war. Dies kann als Hinweis auf einen ätiologischen Zusammenhang von maligner Transformation und HVMA-Infektion gewertet werden.
- Dass zwei Tiere über den Beobachtungszeitraum von sechs Monaten keine Tumore entwickelten, lässt auf individuelle Unterschiede in der immunologischen Kontrolle der Virusinfektion schließen. Die HVMA-Infektion bei Kaninchen weist somit Parallelen zu einer reaktivierten EBV-Infektion unter Immunsuppression auf, die bei Patienten nach Knochenmarktransplantation häufig zu lebensbedrohlichen lymphoproliferativen Erkrankungen führt.

8. Literaturverzeichnis

- Abedi MR, Christensson B, al-Masud S, Hammarstrom L and Smith CI (1993) Gamma-globulin modulates growth of EBV-derived B-cell tumors in SCID mice reconstituted with human lymphocytes. *Int J Cancer* 11: 824-829.
- Abedi MR, Hammarstrom L, Broome U, Angelin B, Smith CI and Christensson B. (1996) Reduction in serum levels of antimitochondrial (M2) antibodies following immunoglobulin therapy in severe combined immunodeficient (SCID) mice reconstituted with lymphocytes from patients with primary biliary cirrhosis (PBC). *Clin Exp Immunol.* 105: 266-73.
- Alfieri C, Birkenbach M and Kieff E (1991) Early events in Epstein-Barr virus infection of human B lymphocytes. *Virology* 185: 595-608.
- Akasaka T, Muramatsu M, Kadowaki N, Ohno H, Ishizaki K, Yamabe H, Fukuhara S and Okuma M (1996) p53 mutation in B-cell lymphoid neoplasms with reference to oncogene rearrangements associated with chromosomal translocations. *Jpn J Cancer Res* 87: 930-7.
- Anagnostopoulos I, Hummel M, Kreschel C and Stein A (1995) Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus infected cells in acute infectious mononucleosis: implications for the interindividual infection route of Epstein-Barr virus. *Blood* 85: 744-750.
- Andersson J, Britton S, Ernberg I, Andersson U, Henle W, Skoldenberg B and Tisell A (1986) Effect of acyclovir on infectious mononucleosis: a double-blind, placebo-controlled study. *J Infect Dis* 153: 283-90.
- Andersson J, Skoldenberg B, Henle W, Giesecke J, Ortqvist A, Julander I, Gustavsson E, Akerlund B, Britton S and Ernberg I (1987) Acyclovir treatment in infectious mononucleosis: a clinical and virological study. *Infection* 15: 14-20.
- Babcock GJ, Decker LL, Volk M and Thorley-Lawson DA (1998) EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* 9: 395-404.
- Baer R, Bankier AT, Biggin MD, Deininger OL, Farrell PJ, Gibson TJ, Hatfull G, Hudson, GS, Satchwell GC, Seguin C, Tuffnell PS and Barrell BG (1984) DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* 310: 207-211.
- Bai X, Hosler G, Rogers BB, Dawson DB and Scheuermann RH (1997) Quantitative polymerase chain reaction for human herpesvirus diagnosis and measurement of Epstein-Barr virus burden in posttransplant lymphoproliferative disorder. *Clin Chem* 43: 1843-9.
- Bar RS, DeLor CJ, Clausen KP, Hurtubise P, Henle W and Hewetson JF (1974) Fatal infectious mononucleosis in a family. *N Engl J Med* 290: 363-367.

- Bashir R, Okano M, Kleveland K, Pirruccell S, Masih A, Sanger W, Fordyce-Boyer R and Purtillo D. (1991) SCID/human mouse model of central nervous system lymphoproliferative disease. *Lab Invest* 65: 702-709.
- Bauer G, Hofler P and Zur Hausen H (1982) Epstein-Barr virus induction by a serum factor, Induction and cooperation with additional inducers. *Virology* 121: 184-194.
- Bauer G (1992) The diagnostic value of Epstein-Barr virus diagnosis. *Internist* 33: 586-92.
- Bayliss GJ and Wolf H (1984) An Epstein-Barr virus early protein induced cell fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 7162-716.
- Baylis SA, Young LS, Purifoy DJ and Littler E (1991) Immunological studies on the Epstein-Barr virus encoded alkaline deoxyribonuclease found in virus-producing lymphoblastoid cells. *J Gen Virol* 72: 399-404.
- Birkeland SA, Andersen HK and Hamilton-Dutoit SJ (1999) Preventing acute rejection, Epstein-Barr virus infection, and post transplant lymphoproliferative disorders after kidney transplantation: use of Aciclovir and mycophenolate mofetil in a steroid free immunosuppressive protocol. *Transpl* 67: 1209-1214.
- Birx DL, Redfield RR and Tosato G (1986) Defective regulation of Epstein-Barr virus infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) or AIDS related disorders. *N Engl J Med* 314: 874-879.
- Bohlen H, Manzke O, Titzer S, Lorenzen J, Kube D, Engert A, Abken H, Wolf J, Diehl V and Tesch H (1997) Prevention of Epstein-Barr virus-induced human B-cell lymphoma in severe combined immunodeficient mice treated with CD3xCD19 bispecific antibodies, CD28 monospecific antibodies, and autologous T cells. *Cancer Res* 57: 1704-9.
- Bollard CM, Rooney CM, Huls MH (2000) Long term follow-up of patients who received EBV specific CTL's for prevention or treatment of EBV lymphoma. *Blood* 96: 478a.
- Bosma GC, Custer RP and Bosma MJ. (1983) A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 301: 527-30.
- Boyle GJ, Michaels MG, Webber SA, Knisely AS, Kurland G, Cipriani LA, Griffith BP and Fricker FJ (1997) Posttransplantation lymphoproliferative disorders in pediatric thoracic organ recipients. *J Pediatr* 131: 309-313.
- Brandt CD, Sison AV, Rakusan TA, Saxena ES, Kaufman TE, O'Donnell RM and Sever LJ, (1998) Epstein-Barr virus DNA in the blood of infants, young children and adults by age and HIV-status. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 17: 69-72.

- Brichacek B, Hirsch I, Sibl O, Vilikusova E and Vonka V (1983) Association of some supraglottic laryngeal carcinomas with EB-virus. *Int J Cancer* 32: 193-197.
- Brichacek B, Hirsch I, Sibl O, Vilikusova E and Vonka E (1984). Presence of Epstein-Barr virus DNA in carcinomas of the palatine tonsil. *J Natl Cancer Inst* 72: 809-815.
- Bronstein I, Voyta JC, Vant Erve Y and Kricka LJ (1991) Advances in ultrasensitive detection of proteins and nucleic acids with chemiluminescence: novel derivatized 1,2-dioxetane enzyme substrates. *Clin Chem* 37: 1526-7.
- Briz M, Fores R, Regidor C, Busto MJ, Ramon y Cajal S, Cabrera R, Diez JL, Sanjuan I and Fernandez MN (1997) Epstein-Barr virus associated B-cell lymphoma after autologous bone marrow transplantation for T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 98: 485-487.
- Buchsbaum RJ, Fabry JA and Lieberman J (1996) EBV-specific cytotoxic T lymphocytes protect against human EBV-associated lymphoma in scid mice. *Immunol Lett* 52: 145-52.
- Burkhardt AL, Bolen JB, Kieff E and Longnecker R (1992) An Epstein-Barr virus transformation-associated membrane protein interacts with src family tyrosine kinases. *J Virol* 66: 5161-5167.
- Burkitt DB (1958) A sarcoma involving the jaws in african children. *Br J Surg* 46: 218-224.
- Caputo JL (1991) An effective method for establishing human B lymphoblastic cell lines using Epstein-Barr virus. *J Tissue Culture Methods* 13: 39-44.
- Carpenter PA, Corey L, Tso JY and Anasetti C (2000) Humanized non-FCR-binding anti-CD3 antibody as therapy for glucocorticoid refractory acute GVHD. *Blood* 96: 476a.
- Cesarman E (2002) Epstein-Barr virus (EBV) and lymphomagenesis. *Front Biosci* 7: e58-65.
- Chen MR, Hsu TY, Chen JY and Yang CS (1990) Molecular characterization of a cDNA clone encoding the Epstein-Barr virus (EBV) DNase. *J Virol Methods* 29: 127-41.
- Chen HL, Hayashi K, Koirala TR, Ino H, Fujimoto K, Yoshikawa Y, Choudhury CR and Akagi T (1997) Malignant lymphoma induction in rabbits by oral inoculation of crude virus fraction prepared from Ts-B6 cells (cynomolgus B-lymphoblastoid cells harboring Epstein-Barr virus-related simian herpesvirus). *Acta Med Okayama* 51: 141-7.

- Cheng YC, Huang ES, Lin JC, Mar EC, Pagano JS, Dutschman GE and Grill SP (1983) Unique spectrum of activity of 9-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl]guanine against herpesviruses in vitro and its mode of action against herpes simplex virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80: 2767-70.
- Cheng J and Mitchelson KR (1994) Glycerol-enhanced separation of DNA fragments in entangled solution capillary electrophoresis. *Anal Chem* 66: 4210-4.
- Cihlar T, Votruba I, Horská K, Liboska R, Rosenberg I and Holy A (1992) Metabolism of 1-(S)-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine (HPMPC) in human embryonic lung cells. *Collect Czech Chem Commun* 57: 661-672.
- Cleary ML, Epstein MA, Finerty S, Dorfman RF, Borkamm GW, Kirkwood JK, Morgan AJ and Sklar J (1985) Individual lymphomas in Tamarines arise from different B-cell clones. *Science* 228: 722-724.
- Clough W (1980) An endonuclease isolated from Epstein-Barr virus-producing human lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77: 6194-8.
- Cohen JL, Wang F, Mannick J and Kieff E (1989) Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 9558-9562.
- Colby BM, Shaw JE, Elion GB and Pagano JS (1980) The effect of acyclovir [9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine] on Epstein-Barr virus DNA replication. *J Virol* 34: 560-568.
- Colby BM, Shaw JE, Datta AK and Pagano JS (1982) Replication of Epstein-Barr virus DNA in lymphoblastoid cells treated for extended periods with acyclovir. *Am J Med* 73: 77-81.
- Countryman J, Jenson H, Seibl R, Wolf H and Miller G (1987) Polymorphic proteins encoded within BZLF1 of defective and standard Epstein-Barr viruses disrupts latency. *J Virol* 61: 3672-3679.
- Cuomo L, Ramquist T, Trivedi P, Wang F, Klein G and Masucci MG (1992) Expression of the Epstein-Barr virus (EBV)-encoded membrane protein LMP1 impairs the in vitro growth, clonability and tumorigenicity of an EBV-negative Burkitt lymphoma line. *Int J Cancer* 51: 949-55.
- Daibata M, Speck SH, Mulder C and Sairenji T (1994) Regulation of the BZLF1 promoter of Epstein-Barr virus by second messengers in anti-immunoglobulin-treated B cells. *Virology* 198: 446-54.
- Davis CL, Harrison KL, McVicar JP, Forg PJ, Bronner MP and Marsh CL. (1995) Antiviral prophylaxis and the Epstein Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disorder. *Clin Transplant* 9: 53-9.

- Davis KR, Hinrichs SH, Fidler JL, Henry TJ, Davis JR, Baker KS, Gordon BG and Gross TG (1999) Post-transplant EBV associated meningoencephalitis and lymphoid interstitial pneumonitis. *Bone Marrow Transplant* 24: 443-444.
- Davis TA, Czerwinski DK and Levy R (1999) Therapy of B-cell lymphoma with anti-CD20 antibodies can result in the loss of CD20 antigen expression. *Clin Cancer Res.* 5: 611-615.
- De Clercq E (1993) Therapeutic potential of HPMPC as an antiviral drug. *Rev Med Virol* 3: 85-96.
- De Clercq E (1996) Therapeutic potential of cidofovir (HPMPC, Vistide™) for the treatment of DNA virus (i.e. herpes-, papova-, pox- and adenovirus) infections. *Verh K Acad Geneesk Belg* 58: 19-49.
- De Clercq E (2001) Vaccinia virus inhibitors as a paradigm for the chemotherapy of poxvirus infections. *Clin Microbiol Rev* 14: 382-397.
- De Clercq E (2002a) Cidofovir in the treatment of poxvirus infections. *Antiviral Res* 55: 1-13.
- De Clercq E (2002b) Cidofovir in the therapy and short-term prophylaxis of poxvirus infections. *Trends Pharmacol Sci* 23: 456-458.
- De Clercq E (2003) Clinical potential of the acyclic nucleoside phosphonates cidofovir, adefovir, and tenofovir in treatment of DNA virus and retrovirus infections. *Clin Microbiol Rev* 16: 569-96.
- Dellemijn PL, Brandenburg A, Niesters HG, van den Bent MJ, Rothbarth PH and Vlasveld LT (1995) Successful treatment with ganciclovir of presumed Epstein-Barr meningo-encephalitis following bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplant* 16: 311-312.
- Delone P, Corkill J, Jordan M, Krapiva P, Ghasemian R, Sasaki T and Light JA (1995) Successful treatment of Epstein-Barr virus infection with ganciclovir and cytomegalus hyperimmune globulin following kidney transplantation. *Transplant Proc* 27: 58-59.
- De Oliveira CBR, Stevenson D, LaBree, McDonnell PJ and Trousdale MD (1996) Evaluation of cidofovir (HPMPC, GS-504) against adenovirus type 5 infection in vitro and in a New Zealand rabbit ocular model. *Antiviral Res* 31: 165-172.
- Dosch HM, Cochrane DM, Cook VA, Leeder JS and Cheung RK (1991) Exogenous but not endogenous EBV induces lymphomas in beige/nude/xid mice carrying human lymphoid xenografts. *Int Immunol* 3: 731-5.
- Duan J, Paris W, De Marte J, Roopchand D, Fleet TL and Cordingley MG (2000) Topical effects of cidofovir on cutaneous rabbit warts: treatment regimen and inoculum dependence. *Antiviral Res* 46: 135-44.

- Emanuel JR (1991) Simple and efficient system for synthesis of non-radiocative nucleic acid hybridisation probes using PCR. *Nucleic Acids Research* 19: 2790.
- Epstein MA, Achong BG and Barr YM (1964) Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1: 702-703.
- Epstein MA, Achong BG und Barr YM (1965) Studies with Burkitt's lymphoma. *Wistar Inst Symp Monogr* 4: 69-82.
- Falk L, Deinhardt F, Wolfe L, Johnson D, Hilgers J and DeThe' G (1976a) Epstein-Barr virus: Experimental infection of *Callithrix jacchus* marmosets. *Int J Cancer* 17: 785-788.
- Falk L, Deinhardt F, Nonoyama M, Wlfe LG, Bergholz C, Lapin B, Yakovleva L, Agrba V, Henle G and Henle W (1976b) Properties of baboon lymphotropic herpesvirus related to Epstein-Barr virus. *Int J Cancer* 18: 798-807.
- Farrell PJ, Hollyoake M, Niedobitek G, Agathangelou A, Morgan A and Wedderburn N (1997) Direct demonstration of persistent Epstein-Barr virus gene expression in peripheral blood of infected common marmosets and analysis of virus-infected tissues in vivo. *J Gen Virol* 1997 78: 1417-24.
- Feighny RJ, Henry BE 2nd, Datta AK and Pagano JS (1980) Induction of DNA polymerase activity after superinfection of Raji cells with Epstein-Barr virus. *Virology* 107: 415-23.
- Finerty S, Tarlton J, Mackett M, Conway M, Arrand JR, Watkins PE and Morgan AJ (1992) Protective immunization against Epstein-Barr virus-induced disease in cottontop tamarins using the virus envelope glycoprotein gp340 produced from a bovine papillomavirus expression vector. *J Gen Virol* 73: 449-53.
- Fingerroth JD, Weis JJ, Tedder TF, Strominger JL, Biro PA and Fearon DT (1984) Epstein-Barr virus receptor on human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 4510-4514.
- Flavell DJ (1996) Modelling human leukemia and lymphoma in severe combined immunodeficient (SCID) mice: practical applications. *Hematol Oncol* 14: 67-82.
- Fong IW, Ho J, Toy C, Lo B and Fong MW (2000) Value of long-term administration of acyclovir and similar agents for protecting against AIDS-related lymphoma: case-control and historical cohort studies. *Clin Infect Dis* 30: 757-761.
- Fontan J, Bassignot A, Mouglin C, Cahn JY and Lab M (1998) Detection of Epstein-Barr virus DNA in serum of transplanted patients: a new diagnostic guide for lymphoproliferative diseases. *Leukemia* 12: 772.

- Fries KL, Miller WE und Raab-Traub N (1996) Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 blocks p53-mediated apoptosis through the induction of the A20 gene. *J Virol* 70: 8653-8659.
- Fries KL, Sculley TB, Webster-Cyriaque J, Rajadurai P, Sadler RH und Raab-Traub N (1997) Identification of a novel protein encoded by the BamHI A region of the Epstein-Barr-virus. *J Virol* 71: 2765-2771.
- Fukayama M, Hayashi Y, Iwasaki Y, Chong J, Ooba T, Takizawa T, Koike M, Mizutani S, Miyaki M and Hirai K (1994) Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma and Epstein-Barr virus infection of the stomach. *Lab Invest*: 73-81.
- Fukuhara S and Rowley JD (1978) Chromosome 14 translocations in non-Burkitt lymphomas. *Int J Cancer* 15: 14-21.
- Furlong D, Swift H and Roizman B (1972) Arrangement of herpesvirus desoxyribonucleic acid in the core. *J Virol* 10: 1071-1074.
- Fuzzati-Armentero MT and Duchosal MA (1998) hu-PBL-SCID mice: an in vivo model of Epstein-Barr virus-dependent lymphoproliferative disease. *Histol Histopathol* 13: 155-68.
- Garnier JL, Cannon MJ, Chargui J, Touraine JL and Cooper NR (1993a) EBV human B-cell lymphomas in Scid mice: description of the model and study of the role of anti-CD40 and anti-CD23 monoclonal antibodies in their development. *Transplant Proc* 25: 1387-8.
- Garnier JL, Cooper NR and Cannon MJ (1993b) Low expression of CD20 and CD23 in Epstein-Barr virus-induced B cell tumors in SCID/hu mice. *Am J Pathol* 142: 353-8.
- Gerber P, Pritchett RF and Kieff E (1976) Antigens and DNA of a chimpanzee agent related to Epstein-Barr virus. *J Virol* 19: 1090-1099.
- Gordon YJ, Naesens L, DeClercq E, Maudgal PC and Veckeneer M (1996) Treatment of adenoviral conjunctivitis with topical cidofovir. *Cornea*. 15: 546.
- Gratama JW, Oosterveer MAP, Zwann FE, Lepoutre JMM, Klein G and Ernberg I (1988) Eradication of Epstein-Barr virus by allogeneic bone marrow transplantation: implications for sites of viral latency. *Proc Natl Sci U S A* 85: 8693-8696.
- Gratama JW, Oosterveer MA, Lepoutre JM, van Rood JJ, Zwaan FE, Vossen JM, Kapsenberg JG, Richel D, Klein G and Ernberg I (1990) Serological and molecular studies of Epstein-Barr virus infection in allogeneic marrow graft recipients. *Transplantation* 50: 910.
- Greenspan D and Greenspan JS (1989) Oral hairy leukoplakia: diagnosis and management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 67: 396-403

- Greenspan D, De Souza YG, Conant MA, Hollander H, Chapman SK, Lennette ET, Petersen V and Greenspan JS (1990) Efficacy of desiclovir in the treatment of Epstein-Barr virus infection in oral hairy leukoplakia. *J Acquir Immune Defic Syndr* 3: 571-578.
- Greenspan JS, Greenspan D, Lennette ET, Abrams DI, Conant MA, Petersen V and Freese UK (1985) Replication of the Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral "hairy" leukoplakia, an AIDS associated lesion. *New Engl J Med* 313: 1564-1571.
- Grishaber JE, McClain KL, Mahoney Jr DH and Fernback DJ (1988) Successful outcome of severe aplastic anaemia following Epstein-Barr virus infection. *Am J Hematol* 28: 273-275.
- Grogan E, Jenson H, Countrymen J, Heston L, Gradoville L and Miller G (1987) Transfection of rearranged viral DNA fragment, Wzhet, stably converts latent Epstein-Barr viral infection to productive infection in lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 1332-1336.
- Gruhn B, Meerbach A, Egerer R, Mentzel HJ, Hafer R, Ringelmann F, Sauer M, Hermann J and Zintl F (1999) Successful treatment of Epstein-Barr virus-induced transverse myelitis with ganciclovir and cytomegalovirus hyperimmune globulin following unrelated bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 24: 1355-1358.
- Gruhn B, Meerbach A, Hafer R, Zell R, Wutzler P and Zintl F (2003) Pre-emptive therapy with rituximab for prevention of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 31: 1023-5.
- Hallee TJ, Evans AS, Niederman JC, Brooks CM and Voegtly H (1974) Infectious mononucleosis at the United States Military Academy. A prospective study of a single class over four years. *Yale J Biol Med* 47: 182-95.
- Hammerschmidt W and Sudgen B (1988) Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell* 55: 427-433.
- Hammerschmidt W and Sudgen B (1989) Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature* 340: 393-397.
- Hanto DW, Frizzera G, Gajl-Peczalska KJ, Sakamoto K, Purtilo DT, Balfour HH Jr, Simmons RL and Najarian JS (1982) Epstein-Barr virus-induced B-cell lymphoma after renal transplantation: acyclovir therapy and transition from polyclonal to monoclonal B-cell proliferation. *N Engl J Med* 306: 913-8.
- Hanto DW, Frizzera G, Gajl-Peczalska KJ and Simmons RL (1985) Epstein-Barr virus, immunodeficiency and B-cell lymphoproliferation. *Transplantation* 39: 461-471.

- Haque T, Thomas JA, Falk KI, Parratt R, Hunt BJ, Yacoub M and Crawford DH (1996) Transmission of donor Epstein-Barr virus (EBV) in transplanted organs causes lymphoproliferative disease in EBV-seronegative recipients. *J Gen Virol* 77: 1169-1172.
- Haralambieva E, Banham AH, Bastard C, Delsol G, Gaulard P, Ott G, Pileri S, Fletcher JA and Mason DY (2003). Detection by the fluorescence in situ hybridization technique of MYC translocations in paraffin-embedded lymphoma biopsy samples. *Br J Haematol* 121: 49-56.
- Hauke RJ, Greiner TC, Smir BN, Vose JM, Tarantolo SR, Bashir RM and Bierman PJ (1998) Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorder after autologous bone marrow transplantation: report of two cases. *Bone Marrow Transplant.* 21: 1271-1274.
- Hayashi K, Ohara N, Koirala TR, Ino H, Chen HL, Teramoto N, Kondo E, Yoshino T, Takahashi K and Yamada M (1994) HTLV-II non-integrated malignant lymphoma induction in Japanese white rabbits following intravenous inoculation of HTLV-II-infected simian leukocyte cell line (Si-IIA). *Jpn J Cancer Res* 85(8): 808-18
- Hayashi K, Koirala TR, Ino H, Chen HL, Ohara N, Teramoto N, Yoshino T, Takahashi K, Yamada M and Nii S (1995) Malignant lymphoma induction in rabbits by intravenous inoculation of Epstein Barr-virus-related herpesvirus from HTLV-II-transformed cynomolgus leukocyte cell line (Si-IIA). *Int J Cancer* 63: 872-80.
- Hayashi K, Chen WG, Chen YY, Bacchi MM, Bacchi CE, Alvarenga M, Abreu ES, Chang KL and Weiss LM. (1997) Deletion of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 gene in United States and Brazilian Hodgkin's disease and reactive lymphoid tissue: high frequency of a 30-bp deletion *Hum Pathol* 12:1408-14.
- Hayashi k, Hong-li c, Hroyuki Y, Tirtha RK, Nbuya O, Norihiro T, Takashi O, Tadashi Y, Kiyoshi T, Kanji M, Koji F, Yasuhiro Y and Tadaatsuu Akagi (1999) Cyno-EBV (EBV-related Herpesvirus from Cynomolgus Macaques) induces Rabbit Malignant Lymphomas and their tumor cell lines frequently show specific chromosomal abnormalities *Lab Invest* 7: 823-835.
- Heath CW, Brodsky AL and Potolsky AI (1972) Infectious mononucleosis in a general population. *Am J Epidemiol* 95: 46-52.
- Henle W and Henle G (1968) Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 59: 94-101.
- Henle W and Henle G (1979a) Seroepidemiology of the virus. In: Epstein MA and Achong BG (eds.) *The Epstein-Barr virus*. Springer, Berlin-Heidelberg-New York: 61-78.

- Henle W and Henle G (1979b) The virus as the etiologic agent of infectious mononucleosis. In: Epstein MA and Achong BG (eds.): The Epstein-Barr-Virus. Springer, Berlin-Heidelberg-New York: 297-320.
- Herbst JS, Morgan J, Raab-Traub N and Resnick L (1989) Comparison of the efficacy of surgery and acyclovir therapy in oral hairy leukoplakia. *J Am Acad Dermatol* 21: 753-756.
- Heslop HE, Ng CYC, Li C, Smith CA, Loftin SK, Krance RA, Brenner MK and Rooney CM (1996) Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nat Med* 2: 551-555.
- Hitt MM, Allday MJ, Hara T, Karran L, Jones MD, Busson P, Tursz T, Ernberg I and Griffin BE (1989) EBV gene expression in an NPC-related tumor. *EBMO* 8: 2639-2651.
- Ho HT, Woods KL, Bronson JJ, De Boeck H, Martin JC and Hitchcock MJM (1992) Intracellular metabolism of the antiherpes agent (S)-1-[3-hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)propyl]-cytosine. *Mol Pharmacol* 41: 197-202.
- Homma T, Kanki PJ, King NW Jr, Hunt RD, O'Connell MJ, Letvin NL, Daniel MD, Desrosiers RC, Yang CS and Essex M (1984) Lymphoma in macaques: association with virus of human T lymphotropic family. *Science* 225: 716-8.
- Howe JG and Steitz JA (1986) Localisation of Epstein-Barr virus-encoded small RNAs by in situ hybridisation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 9006-9010.
- Humme S, Reisbach G, Feederle R, Delecluse HJ, Bousset K, Hammerschmidt W and Schepers A (2003) The EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) enhances B cell immortalization several thousandfold. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100: 10989-94.
- Ino H, Hayashi K, Yanai H, Teramoto N, Koirala TR, Chen HL, Oka T, Yoshino T, Takahashi K and Akagi T (1997) Analysis of the genome of an Epstein-Barr-virus (EBV)-related herpesvirus in a cynomolgus monkey cell line (Si-IIA). *Acta Med Okayama* 51: 207-12.
- Ishida T, Yamamoto K, Ishimoto G, Shotake T, Takenaka O, Nozawa K, Hayami M and Hinuma Y (1985) A field study of infection with human T-cell leukemia virus among asian primates. *Microbiol Immunol* 29: 839-46.
- Ishida T and Yamamoto K (1987) Survey of non human primates for antibodies reactive with Epstein-Barr virus (EBV) antigens and susceptibility of their lymphocytes for immortalization with EBV. *J Med Primatol* 16: 359-371.
- Ishida T and Varavudhi P (1992) Wild long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*) in Thailand are highly infected with gamma herpes virus but not with simian T-lymphotropic retrovirus of type 1. *Folia Primatol* 59: 163-168.

- Ishida T, Suzuki J and Yamamoto K (1993) Serological features of infection with an Epstein-Barr virus-like agent in Japanese macaques (*Macaca fuscata*). *Folia Primatol* 61: 228-33.
- Ishida Y, Yokota Y, Tauchi H, Fukuda M, Takaoka T, Hayashi M and Matsuda H (1993) Ganciclovir for chronic active Epstein-Barr virus infection. *Lancet* 341: 560-561.
- Jensen BL, Weismann K, Sindrup JH, Sondergaard J and Schmidt K (2000) Incidence and prognostic significance of skin disease in patients with HIV/AIDS: a 5-year observational study. *Acta Derm Venerol* 80: 140-143.
- Joab I (1999) Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma *Med Trop (Mars)* 59(4 Pt 2): 499-502.
- Jones JF, Shurin S, Abramowsky C, Tubbs RR, Sciotto CG, Wahl R, Sands J, Gottman D, Katz BZ and Sklar J (1988) T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infection. *New Engl J Med* 318: 733-741.
- Johannessen I and Crawford DH (1999) In vivo models for Epstein-Barr (EBV)-associated B cell lymphoproliferative disease (BLPD). *Rev Med Virol* 9: 263-277.
- Kakubava VV, Agrba VZ, Timanovskaja VV and Brzhikhackek B (1990) Analysis of B-lymphotropic oncogenetic herpesvirus of *Macaca arctoides*. *Eksp Onkol* 12: 44-46.
- Kaufman HE, Varnell ED and Thompson HW (1999) Cidofovir and experimental herpetic stromal disease. *Arch Ophthalmol* 117: 925-928.
- Kedes DH and D Ganem (1997) Sensitivity of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus replication to antiviral drugs. *J Clin Investig* 99: 2082-2086.
- Kenagy DN, Schlesinger Y, Weck K, Ritter JH, Gaudreault-Keener MM and Storch GA (1995) Epstein-Barr virus DNA in peripheral blood leukocytes of patients with posttransplant lymphoproliferative disease. *Transplantation* 60: 547-554.
- Kenney S, Kamine J, Holley-Guthrie E, Lin JC, Mar EC and Pagano J (1989) The Epstein-Barr virus (EBV) BZLF1 immediate-early gene product differentially affects latent versus productive EBV promoters. *J Virol* 63: 1729-1736.
- Kieff E and Liebowitz D (1990) Epstein-Barr virus and its replication. In *Virology*, 2nd edn, BN Fields and DM Knipe (eds), Raven Press, New York: pp 1889-1920.
- Kieff E (1995a) Epstein-Barr virus: New insights. *J Inf Dis* 171: 1323-1224.

- Kieff E (1995b) Epstein-Barr virus - increasing evidence of a link to carcinoma. *N Engl J Med* 333: 724-726.
- Kieff E: Epstein-Barr virus and its replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howely PM (eds.): *Fields virology 3rd*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia (1996) 1889-1911, 2343-2396.
- Kienzle N, Buck M, Greco S, Krauer K and Sculley TB (1999) Epstein-Barr virus-encoded RK-BARF0 protein expression. *J Virol* 78: 8902-8906.
- Klein G, Dombos L and Gothskar B (1972) Sensitivity of Epstein-Barr virus (EBV) producer and non-producer human lymphoblastoid cell lines to superinfection with EB-virus. *Int J Cancer* 10: 44-57.
- Klein G, Giovanella B, Westman A, Stehlin JS, Mumford D (1975) An EBV-genome-negative cell line established from an American Burkitt lymphoma; receptor characteristics. EBV infectibility and permanent conversion into EBV-positive sublines by in vitro infection. *Intervirology* 5: 319-34.
- Klein G (1979) Lymphoma development in mice and humans: Diversity of initiation is followed by convergent cytogenetic evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 2442-2446.
- Kuehnle I, Huls MH, Liu Z, Semmelmann M, Krance RA, Brenner MK, Rooney CM and Heslop HE (2000) CD20 monoclonal antibody (rituximab) for therapy of Epstein-Barr virus lymphoma after hemopoietic stem-cell transplantation. *Blood* 95: 1502-1505.
- Kulchiwit W, Edwards RH, Davenport EM, Baskar JF, Godfrey V and Raab-Traub N (1998) Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 11963-11968.
- Kuo PC, Dafoe DC, Alfrey EJ, Sibley RK and Scandling JD (1995) Posttransplant lymphoproliferative disorders and Epstein-Barr virus prophylaxis. *Transplantation* 59: 135-138.
- Lacerda JF, Ladanyi M, Jagiello C and O'Reilly RJ (1996a) Administration of rabbit anti-asialo GM1 antiserum facilitates the development of human Epstein-Barr virus-induced lymphoproliferations in xenografted C.B-17 scid/scid mice. *Transplantation* 61: 492-7.
- Lacerda JF, Ladanyi M, Louie DC, Fernandez JM, Papadopoulos EB and O'Reilly RJ (1996b) Human Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T lymphocytes home preferentially to and induce selective regressions of autologous EBV-induced B cell lymphoproliferations in xenografted C.B-17 scid/scid mice. *J Exp Med* 184: 1199.
- Lacy SA, Hitchcock MJM, Lee WA, Tellier P and Cundy KC (1998) Effect of oral probenecid coadministration on the chronic toxicity and pharmacokinetics of intravenous cidofovir in cynomolgus monkeys. *Toxicol Sci* 44: 97-106.

- Lalezari JP, Stagg RJ, Kuppermann BD, Holland GN, Kramer F, Ives DV, Youle M, Robinson MR, Drew WL and Jaffe HS (1997) Intravenous cidofovir for peripheral cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. *Ann Intern Med* 126: 257-263.
- Lam KMC, Syed N, Whittle H and Crawford DH (1991) Circulating Epstein-Barr virus-carrying B cells in acute malaria. *Lancet* 337: 876-878.
- Landon JC and Malan L (1971) Seroepidemiologic studies of Epstein-Barr virus antibody in monkeys. *J Natl Cancer Inst* 46: 881-884.
- Landon JC, Ellis LB, Zeve VH and Fabrizio DP (1968) Herpes-type virus in cultured leucocytes from chimpanzees. *J Natl Cancer Inst* 40: 181-192.
- Lapin BA, Timnaovskaya VV and Yakovleva LA (1985) Herpesvirus HVMA: A new representative in the group of the EBV-like B-lymphotropic herpesvirus of primates. *Hamatol Bluttransfus* 29: 312-313.
- Lawrence JB, Villave CA and Singer RH (1988) Sensitive, high-resolution chromatin and chromosome mapping in situ: presence and orientation of two closely integrated copies of EBV in a lymphoma line. *Cell* 52: 51-61.
- Lehane D (1970) A seroepidemiologic study of infectious mononucleosis in military population. *JAMA* 212: 2240-2242.
- Lennette ET (1990) Epstein-Barr virus. In: Lennette, E.T.: *Laboratory diagnosis of viral infection*, 2nd Marcel Dekker Inc., New York: 365-380.
- Lenoir GM and Bornkamm GW: Burkitt's lymphoma, a human cancer model for the study of the multistep development of cancer: Proposal for a new scenario. In: Klein G (ed.): *Advances in Viral Oncology 7*. Raven Press, New York (1987) S. 173-206.
- Levy JA (1995) A new human herpesvirus: KSHV or HHV8. *Lancet* 34: 786.
- Lewin N, Aman P, Akerlund B, Gustavsson E, Carenfelt C, Lejdeborn L, Klein G and Klein E (1990) 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. *Immunol Lett* 26: 59-65.
- Leyvraz S, Henle W, Chahinian AP, Perlmann C, Klein G, Gordon RE, Rosenblum M and Holland JF (1985) Association of Epstein-Barr virus with thymic carcinoma. *N Engl J Med* 312: 1296-9.
- Li QX, Young LS, Niedobitek G, Dawson CW, Birkenbach M, Wang F and Rickinson AB (1992) Epstein-Barr virus infection and replication in a human epithelial cell system. *Nature* 356: 347-50.

- Li Z, VanCalcar S, Qu C, Cavenee WK, Zhang MQ and Ren B (2003). A global transcriptional regulatory role for c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 8: 8164-9.
- Liekens S, Andrei G, Vandeputte M, De Clercq E and Neyts J (1998) Potent inhibition of hemangioma formation in rats by the acyclic nucleoside phosphonate analogue cidofovir. *Cancer Res* 58: 2562-256.
- Lin JC, Smith MC and Pagano JS (1984) Prolonged inhibitory effect of 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine against replication of Epstein-Barr virus. *J Virol* 50: 55-55.
- Lin JC, Nelson DJ, Lambe CU and Cho EI (1986) Metabolic activation of 9([2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy)methyl]guanine in human lymphoblastoid cell lines infected with Epstein-Barr virus. *J Virol* 60: 569-573.
- Lin JC and Machida H (1988) Comparison of two bromovinyl nucleoside analogs, 1- β -D-arabinofuranosyl-E-5-(2-bromovinyl)uracil and E-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine, with acyclovir in inhibition of Epstein-Barr virus replication. *Antimicrob Agents Chemother* 32: 1068-1072.
- Lin JC, Zhang ZX, Smith MC, Biron K and Pagano JS (1988) Anti-human immunodeficiency virus agent 3'-azido-3'-deoxythymidine inhibits replication of Epstein-Barr virus. *Antimicrob Agents Chemother* 32: 265-7.
- Lin JC, Zhang ZX, Chou TC, Sim I and Pagano JS (1989) Synergistic inhibition of Epstein-Barr virus: transformation of B lymphocytes by alpha and gamma interferon and by 3'-azido-3' deoxythymidine. *J Infect Dis* 159(2): 248-54.
- Lin JC, Reffschlager J, Herrmann G and Pagano, JS (1991a) Evaluation of structure-activity relations between (E)-5-(2-bromovinyl) and 5-vinyl-1- β -D-arabinofuranosyluracil (BV-araU) in inhibition of Epstein-Barr virus replication. *Antiviral Res* 17: 43-52.
- Lin, JC, De Clerq, E and Pagano, JS (1991b) Inhibitory effects of acyclic nucleoside phosphonate analogs, including (s)-1(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)-cytosine, on Epstein-Barr virus replication. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 2440-2443.
- Longnecker R and Miller CL (1996) Regulation of Epstein-Barr virus latency by latent membrane protein 2. *Trends Microbiol* 4: 38-42.
- Lopez C, Watanabe KA and Fox JJ (1980) 2'-Fluoro-5-iodo-aracytosine, a potent and selective anti-herpesvirus agent. *Antimicrob Agents Chemother* 17: 803-806.

- Lucas KG, Burton RL, Zimmerman SE, Wang J, Cornetta KG, Robertson KA, Lee CH and Emanuel DJ (1998) 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* 91: 3654-61.
- Luka J, Kallin B and Klein G (1979) Induction of the Epstein-Barr virus (EBV) cycle in latently infected cells by n-butyrate. *Virology* 94: 228-231.
- Maeda Y, Teshima T, Yamada M, Shinagawa K, Nakao S, Ohno Y, Kojima K, Hara M, Nagafuji K, Hayashi S, Fukuda S, Sawada H, Matsue K, Takenaka K, Ishimaru F, Ikeda K, Niiya K and Harada M (1999a) Monitoring of human herpesviruses after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation and bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 105: 295-302.
- Maeda A, Wakiguchi H, Yokoyama W, Hisakawa H, Tomoda T and Kurashige T (1999b) Persistently high Epstein-Barr virus (EBV) loads in peripheral blood lymphocytes from patients with chronic active EBV infection. *J Infect Dis* 179: 1012-5.
- Maniatis T (1989) In: Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (eds.): molecular cloning. 2nd cold spring harbour laboratory press, New York.
- Magrath I, Jain V and Bhatia K (1992) Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma. *Semin Cancer Biol* 3: 285-95.
- Magrath I and Bhatia K (1999) Breast cancer: a new Epstein-Barr virus-associated disease? *J Natl Cancer Inst* 91: 1-11
- Martel-Renoir D, Grunewald V, Touitou R, Schwaab G and Joab I (1995) Qualitative analysis of the expression of Epstein-Barr virus lytic genes in nasopharyngeal carcinoma biopsies. *J Gen Virol* 76: 1401-8.
- Mayer J, Schwarzmann F, Reischl U and Wolf H, (1993) Pathobiology of Epstein-Barr virus and related diseases. *Biotest Bulletin* 5: 3-12.
- McGuirk JP, Seropian S, Howe G, Smith B, Stoddart L and Cooper DL (1999) Use of rituximab and irradiated donor-derived lymphocytes to control Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferation in patients undergoing related haplo-identical stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 24: 1253-1258.
- Medveczky MM, Horvath E, Lund T and Medveczky PG (1997) In vitro antiviral drug sensitivity of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *AIDS* 11: 1327-1332.
- Meerbach A (1991) Induktion maligner Lymphome im Kaninchen durch Herpesvirus *Macaca arctoides* - ein Tiermodell. *Med Akademie Erfurt, Inst f Med Mikrobiologie, Diss.*

- Meerbach A, Holy A, Wutzler P, De Clerq E and Neyts J (1998) Inhibitory effects of novel nucleoside and nucleotide analogues on Epstein-Barr virus replication. *Antiviral Chem & Chemother* 9: 275-282.
- Meerbach A, Klöcking R, Meier C, Lomp A, Helbig B and Wutzler P (2000a) Inhibitory effect of cycloSaligenyl-nucleoside monophosphates (cycloSal-NMP) of acyclic nucleoside analogues on HSV-1 and EBV. *Antiviral Research* 45: 69-77.
- Meerbach A, Wutzler P, Lomp A and Meier C (2000b) Synthesis properties and anti-EBV activity of a new series of 3'-modified cycloSal-BVDUMP pronucleotides. *Antiviral Res* 46: A82.
- Meerbach A, Gruhn B, Egerer R, Reischl U, Zintl F and Wutzler P (2001) Semiquantitative PCR analysis of Epstein-Barr virus DNA in clinical samples of patients with EBV-associated diseases. *J Med Virol* 65: 348-357.
- Meerbach A, Friedrichs C, Thust R and Wutzler P. (2004) Transformation of rabbit lymphocytes by an Epstein-Barr virus-related herpesvirus from *Macaca arctoides*. *Arch Virol* 149: 1083-94.
- Meier J: Management and Prevention of Epstein-Barr virus infections. In: Straus SE (ed.): Epstein-Barr virus infections: Biology pathogenesis and management. *Ann Intern Med* 118 (1992) S. 45-58.
- Meier J and Straus SE (1992) Comparative biology of latent varicella-zoster virus and herpes simplex virus infections. *J Infect Dis* 166: 13-23.
- Mellinghof I, Daibata M, Humphreys RE, Mulder C, Takada K and Sairenji T (1991) Early events in Epstein-Barr virus genome expression after activation: regulation by second messengers of B cell activation. *Virology* 185: 922-928.
- Middleton T and Sudgen B (1992) EBNA1 can link the enhancer element to the initiator element of the Epstein-Barr virus plasmid origin of DNA replication. *J Virol* 66: 489-495.
- Miller G, Shope T, Lisco H, Sitt D and Lipman M (1972a) Epstein-Barr virus: transformation, cytopathic changes and viral antigens in squirrel monkey and marmoset leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 69: 383-387.
- Miller G, Niederman JC, and Stitt DA (1972b) Infectious mononucleosis: appearance of neutralizing antibody to Epstein-Barr virus measured by inhibition of formation of lymphoblastoid cell lines. *J Infect Dis* 125: 403-6.
- Miller G, Shope T, Coope D, Waters L, Pagano J, Bornkamn G and Henle W (1977) Lymphoma in cotton-top marmosets after inoculation with Epstein-Barr virus: tumor incidence, histologic spectrum antibody responses, demonstration of viral DNA, and characterization of viruses. *J Exp Med* 145: 948-67.

- Miyamoto K, Tomita N, Hayashi K and Akagi T (1990a) Transformation of animal cells with human T-cell leukemia virus type II. *Jpn J Cancer Res* 81: 720-2.
- Miyamoto K, Tomita N, Ohtsuki Y and Kitajima K (1990b) Detection of provirus in an HTLV-II producer CD8+ T cell line by polymerase chain reaction combined with digoxigenin-ELISA method. *Jpn J Cancer Res* 81: 313-6.
- Moghaddam A, Rosenzweig M, Lee-Parritz D, Annis B, Johnson RP and Wang F (1997) An animal model for acute and persistent Epstein-Barr virus infection. *Science* 27: 2030-2033.
- Mosier DE, Gulizia RJ, Baird SM and Wilson DB (1988) Transfer of functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature* 335: 256-259.
- Morgan AJ, Finerty S, Lovgren K, Scullion FT and Morein B (1988) Prevention of Epstein-Barr (EB) virus-induced lymphomas in cottontop tamarins by vaccination with the EB virus envelope glycoprotein gp 340 incorporated into immune-stimulating complexes. *J Gen Virol* 69: 2093-2096.
- Morgan AJ (1991) Control of viral disease: the development of Epstein-Barr virus vaccines. *Springer Semin Immunopathol.* 13: 249-62.
- Morgan AJ (1993): Recent progress in EBV vaccine development. In: Tursz T, Pagano JS, Ablashi DV (eds.): *The Epstein-Barr Virus and Associated Diseases*. INSERM and John Libbey Eurotext, London: 549-555.
- Murray PG and Young LS (2001) Epstein-Barr virus infection: basis of malignancy and potential for therapy. *Expert Rev Mol Med* 3: 1-20.
- Nakamine H, Okano M, Taguchi Y, Pirruccello SJ, Davis JR, Beisel KW, Kleveland K, Sanger WG, Fordyce RR and Purtilo DT (1991) Hematopathologic features of Epstein-Barr virus-induced human B-lymphoproliferation in mice with severe combined immunodeficiency. A model of lymphoproliferative diseases in immunocompromised patients. *Lab Invest* 65: 389-99.
- Nemerow GR, Mold C, Schwend VK, Tollefson V and Cooper NR (1987) Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J Virol* 61: 1416-20.
- Nettleton PF, Gilray JA, Reid HW and Mercer AA (2000) Parapoxviruses are strongly inhibited in vitro by cidofovir. *Antiviral Res* 48: 205-208.
- Newman C and Polk BF (1987) Resolution of oral hairy leukoplakia during therapy with 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine (DHPG). *Ann Intern Med* 107: 348-50.

- Neyts J, Snoeck R, Schols D, Himpens B and De Clercq E (1991a) Sensitive, reproducible and convenient fluorometric assay for the in vitro evaluation of anti-cytomegalovirus agents. *J Virol Methods* 35: 27-38.
- Neyts J, Snoeck R, Balzarini J and De Clercq E (1991b) Particular characteristics of the anti-human cytomegalovirus activity of (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine (HPMPC) in vitro. *Antiviral Res* 16: 41-52.
- Neyts J and De Clercq E (1997) Antiviral drug susceptibility of human herpesvirus 8. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 2754-6.
- Neyts J and De Clercq E (1998) In vitro and in vivo inhibition of murine gamma herpesvirus 68 replication by selected antiviral agents. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 170-172.
- Niedobitek G, Agathangelou A, Finerty S, Tierney R, Watkins P, Jones EL, Morgan A, Young LS and Rooney N (1994) Latent Epstein-Barr virus infection in cottontop tamarins. A possible model for Epstein-Barr virus infection in humans. *Am J Pathol* 145: 969-78.
- Niedobitek G and Young LS (1994) Epstein-Barr virus persistence and virus associated tumors. *Lancet* 343: 333-335.
- Noguchi T, Ikeda K, Yamamoto K, Yoshida I, Ashiba A, Tsuchiyama J, Shinagawa K, Yoshino T, Takata M and Harada M (2001) Antisense oligodeoxynucleotides to latent membrane protein 1 induce growth inhibition, apoptosis and Bcl-2 suppression in Epstein-Barr virus (EBV)-transformed B-lymphoblastoid cells, but not in EBV-positive natural killer cell lymphoma cells. *Br J Haematol* 114: 84-92.
- Nonoyama M and Pagano JS (1973) Homology between Epstein-Barr virus DNA and viral DNA from Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma determined by DNA-DNA reassociation kinetics. *Nature* 242: 44-47.
- Nonoyama M, Huang CH, Pagano JS, Klein G and Singh S (1973) DNA of Epstein-Barr virus detected in tissue of Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70: 3265-3268.
- Ochsendorf FR, Schöfer H, Runne U und Milbrandt R (1988) Therapie der oralen Haarleukoplakie mit Acyclovir. *Hautarzt* 39: 736-738
- Oettle H, Wilborn F, Schmidt CA and Siegert W (1993) Treatment with gangciclovir and Ig for acute Epstein-Barr virus infection after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 82: 2257-2258.
- Ohara N, Hayashi K, Miyamoto K, Tomita N, Fujiwara K, Kondo E, Takahashi K, Ohtsuki Y and Akagi T. (1993) A human T cell line with an abnormal trisomy 2 karyotype established by coculture of peripheral lymphocytes with an HTLV-II-infected simian leukocyte cell line. *Acta Pathol Jpn* 43: 237-43.

- Ohara N, Hayashi K, Teramoto N, Oka T, Fujimoto K, Yoshikawa Y, Castanos-Velez, Biberfeld P and Akagi T (2000) Sequence analysis and variation of EBNA-1 in Epstein-Barr virus-related herpesvirus of cynomolgus monkey. *Intervirology* 43: 102-6.
- Okano M and Gross TG (2000) A review of Epstein-Barr virus infection in patients with immunodeficiency disorders. *Am J Med Sci* 319: 392-396
- Ooka, T (1985) The molecular biology of Epstein-Barr virus. *Biomed Pharmacother* 39: 59-66.
- Orii T, Ohkochi N, Kikuchi H, Koyamada N, Chubachi S, Satomi S, Kimura H, Hoshino Y and Morita M (2000) Usefulness of quantitative real-time polymerase chain reaction in following up patients with Epstein-Barr virus infection after liver transplantation. *Clin Transplant* 14: 308-317.
- Osato T and Imai S (1996) Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Semin Cancer Biol* 7: 175-182.
- Pagano JS, Sixbey, JW and Lin JC (1983) Acyclovir and Epstein-Barr virus infection. *J Antimicrob Chemother* 12 (Suppl.B): 113-121.
- Pagano JS, Jimenez G, Sung NS, Raab-Traub N and Lin JC (1992) Epstein-Barr viral latency and cell immortalization as targets for antisense oligomers. *Ann N Y Acad Sci* 660: 107-16.
- Pallesen G: Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease. In: Dammaco F (ed.): *advances in tumor immunology and allergic disorders*. Editiones Ermes Milan (1992) S. 110-122.
- Papadopoulus EB, Ladanyi M and Emanuel D (1994) Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogenic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 330: 1185-1191.
- Patton LL (2000) Sensitivity, specificity, and positive predictive value of oral opportunistic infections in adults with HIV/AIDS as markers of immune suppression and viral burden. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 90: 182-188.
- Pingel S, Hannig H, Matz-Rensing K, Kaup FJ, Hunsmann G and Bodemer W (1997) Detection of Epstein-Barr virus small RNAs EBER1 and EBER2 in lymphomas of SIV-infected rhesus monkeys by in situ hybridization. *Int J Cancer* 72: 160-5.
- Pirsch JD, Stratta RJ, Sollinger HW, Hefaz GR, D'Alessandro AM, Kalayoglu M and Belzer FO (1989) Treatment of severe Epstein-Barr virus induced lymphoproliferative syndrome with ganciclovir: two cases after solid organ transplantation. *Am J Med* 86: 241-244.

- Pisa P, Cannon MJ, Pisa EK, Cooper NR and Fox RI (1992) Epstein-Barr virus induced lymphoproliferative tumors in severe combined immunodeficient mice are oligoclonal. *Blood* 79: 173-179.
- Pope JH (1967) Establishment of cell lines from peripheral leukocytes in infectious mononucleosis. *Nature* 216: 810-811.
- Pope JH, Achong BG, Epstein MA and Biddulph J (1967) Burkitt Lymphoma in New Guinea: Establishment of a line of lymphoblasts in vitro and description of their fine structure. *J* 39: 933-945.
- Purtilo DT, Cassel CK, Yang JP and Harper R (1975) X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease). *Lancet* 1: 935-940.
- Purtilo DT, Sakamoto K, Barnabei V, Seeley J, Bechtold T, Rogers G, Yetz J and Harada S (1982) Epstein-Barr virus-induced diseases in boys with the X-linked lymphoproliferative syndrome (XLP): update on studies of the registry. *Am J Med* 73: 49-56.
- Purtilo DT, Falk K, Pirruccello SJ, Nakamine H, Kleveland K, Davis JR, Okano M, Taguchi Y, Sanger WG and Beisel KW (1991) SCID mouse model of Epstein-Barr virus-induced lymphomagenesis of immunodeficient humans. *Int J Cancer* 47: 510-517.
- Ragot T, Eloit M and Perricaudet M (1991) Recombinant E1A-defective adenoviruses expressing pseudorabies and Epstein-Barr virus glycoproteins induce immunological responses as live vaccines in rabbits and mice. *Human Gene Transfer*. Eds Cohen-Haguener O, Boiron M, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd Vol 219.
- Ragot T, Finerty S, Watkins PE, Perricaudet M and Morgan AJ (1993) Replication-defective recombinant adenovirus expressing the Epstein-Barr virus (EBV) envelope glycoprotein gp340/220 induces protective immunity against EBV-induced lymphomas in the cottontop tamarin. *J Gen Virol*. 1993 Mar;74 (Pt 3):501-7.
- Rangan SR (1974a) C-type oncogenic viruses of nonhuman primates. *Lab Anim Sci* 24: 193-203.
- Rangan SR (1974b) Antigenic relatedness of simian C-type viruses. *Int J Cancer* 13: 64-70.
- Rangan SR, Lowrie RC, Roberts JA, Johnston PB and Warrick RP (1974) Virus from stump-tailed monkey (*Macaca arctoides*) kidney cultures. *Lab Anim Sci* 24: 211-7.
- Rangan SR, Martin LM, Enright FM and Abee CR (1977) Herpesvirus saimiri-induced lymphoproliferative disease in howler monkeys. *J Natl Cancer Inst* 59: 165-171.

- Rangan SR, Martin LM, Bozelka BE, Wang N and Gormus, BJ (1986) Epstein-Barr virus-related herpesvirus from rhesus monkey (*macaca mulatta*) with malignant lymphoma. *Int J Cancer* 38: 425-432.
- Rea D, Delecluse HJ, Hamilton-Dutoit SJ, Marelle L, Joab I, Edelman L, Finet JF and Raphael M (1994) Epstein-Barr virus latent and replicative gene expression in post transplant lymphoproliferative disorders and AIDS-related non-Hodgkin's lymphomas. French Study Group of Pathology for HIV-associated Tumors. *Ann Oncol* 5 Suppl 1: 113-6.
- Resnick L, Herbst JS, Ablashi DV, Atherton S, Frank B, Rosen L and Horwitz SN (1988) Regression of oral hairy leukoplakia after orally administered acyclovir therapy. *JAMA* 259: 384- 88.
- Rickinson AB and Kieff E (1996) *Fields Virology* (Fields BN, Knipe DM and Howley PM (eds.) 3rd Lippincot-Raven Publishers, Philadelphia: 2397-2446.
- Roizman, B (1996) The function of herpes simplex virus genes: a primer for genetic engineering of novel vectors. *Proc Natl Acad Sci US A.* **93**: 11307-11312.
- Romanowski EG, Bartels SP and Gordon YJ (1999) Comparative antiviral efficacies of cidofovir, trifluridine, and acyclovir in the HSV-1 rabbit keratitis model. *Investig. Ophthalmol. Visual Sci* 40: 378-384.
- Romanowski EG and Gordon YJ (2000) Efficacy of topical cidofovir on multiple adenoviral serotypes in the New Zealand rabbit ocular model. *Investig Ophthalmol. Visual Sci* 41: 460-463.
- Romanowski EG, Yates KA, and Gordon YJ (2001) Antiviral prophylaxis with twice daily topical cidofovir protects against challenge in the adenovirus type 5/New Zealand rabbit ocular model. *Antiviral Res* 52: 275-280.
- Rooney CM, Smith CA, Ng CY, Loftin S, Li C, Krance RA, Brenner MK and Heslop HE (1995a) Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *Lancet* 345: 9-13.
- Rooney CM, Loftin SK, Holladay MS, Brenner MK, Krance RA and Heslop HE (1995b) Early identification of Epstein-Barr virus-associated post-transplantation lymphoproliferative disease. *Br J Haematol* 89: 98-103.
- Rooney CM, Roskrow MA, Suzuki N, Ng CY, Brenner MK and Heslop H (1998a) Treatment of relapsed Hodgkin's disease using EBV-specific cytotoxic T cells. *Ann Oncol* 9: 129-32.
- Rooney CM, Smith CA, Ng CYC, Loftin SK, Sixbey JW, Gan Y, Srivastava DK, Bowman LC, Krance RA, Brenner MK and Heslop HE (1998b) Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* 92: 1549-1555.

- Rooney CM, Roskrow MA, Smith CA, Brenner MK and Heslop HE (1998c) Immunotherapy for Epstein-Barr virus-associated cancers. *J Natl Cancer Inst Monogr*: 89-93.
- Rooney CM and Brenner MK (1998) EBV specific CTL: a model for immune therapy. *Vox Sang* 74: 497-8.
- Rosa MD, Gottlieb E, Lerner MR and Steitz JA (1981) Striking similarities are exhibited by two small Epstein-Barr virus-encoded ribonucleic acids and the adenovirus-associated ribonucleic acids VAI and VAII. *Mol Cell Biol* 1: 785-796.
- Rowe DT, Qu L, Reyes J, Jabbour N, Yunis E, Putnam P, Todo S and Green M (1997) Use of quantitative competitive PCR to measure Epstein-Barr virus genome load in the peripheral blood of pediatric transplant patients with lymphoproliferative disorders. *J Clin Microbiol* 35: 1612-1615.
- Rowe DT (1999) Epstein-Barr virus immortalisation and latency. *Front Biosci* 4: D346-D371.
- Rowe M, Young LS, Crocker J, Stokes H, Henderson S and Rickinson AB (1991) Epstein-Barr virus (EBV)-associated lymphoproliferative disease in the SCID mouse model: implications for the pathogenesis of EBV-positive lymphomas in man. *J Exp Med* 1991 173: 147-58.
- Sadler RH and Raab-Traub N (1995) Structural analysis of the Epstein-Barr virus BamHI A transcripts. *J Virol* 69: 1132-1141.
- Savoie A, Perpete C, Carpentier L, Joncas J and Alfieri C (1994) Direct correlation between the load of Epstein-Barr virus-infected lymphocytes in the peripheral blood of pediatric transplant patients and risk of lymphoproliferative disease. *Blood* 83: 2715-2722.
- Sawyer RN, Evans AS, Niederman JC and McCollum RW (1971) Prospective studies of a group of Yale University freshmen. I. Occurrence of infectious mononucleosis. *J Infect Dis* 123(3): 263-70.
- Schätzl H, Tschikobava M, Rose D, Voevodin A, Nitschko H, Sieger E, Busch U, von der Helm K and Lapin B (1993) The Sukhumi primate monkey model for viral lymphomagenesis: high incidence of lymphomas with presence of STLV-I and EBV-like virus. *Leukemia* 7 Suppl 2: 86-92.
- Schooley RT and Dolin R (1990): Epstein-Barr virus and infectious mononucleosis. In: Mandell GL, Douglas jr RG and Bennett JE (eds.): *Principles and practice of infectious disease* 3rd. Churchill-Livingstone, New-York: 1172-1185.
- Schuster V, Seidenspinner S and Kreth HW (1993) Epstein-Barr virus-related diseases in childhood. *Biotest Bulletin* 5: 13-20.

- Shapiro RS, McClain K, Frizzera G, Gajl-Peczalska KJ, Kersey JH, Blazar BR, Arthur DC, Patton DF, Greenberg JS and Burke B (1988) Epstein-Barr virus associated B cell lymphoproliferative disorders following bone marrow transplantation. *Blood* 71: 1234-43.
- Sharp, TV, Schwemmle M, Jeffrey I, Laing K, Mellor H, Proud CG, Hilse K and Clemens MJ (1993) Comparative analysis of the regulation of the interferon-inducible protein kinase PKR by Epstein-Barr virus RNAs EBER-1 and EBER-2 and adenovirus VAI RNA. *Nucleic Acid Res* 21: 4483-4490.
- Sixbey JW, Nedrud JG, Raab-Traub N, Hanes RA and Pagano JS (1984) Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N Engl J Med* 310: 1225-1230.
- Sixbey JW, Lemon SM and Pagano JS (1986) A second site for Epstein-Barr virus shedding: The uterine cervix. *The Lancet* 2: 1122-1124.
- Sixbey JW and Yao QY(1992) Immunoglobulin A-induced shift of Epstein-Barr virus tissue tropism. *Science* 20; 255: 1578-80.
- Simons JW (1982) The biology of nasopharyngeal carcinoma. *UICC Technical Report Series* 71: 1-87.
- Smee DF, Burger RA, Warren RP, Bailey KW, and Sidwell RW (1997) An immunosuppressed mouse model of lethal murine gammaherpesvirus 68 infection for studying potential treatment of Epstein-Barr virus infection in man. *Antiviral Chem Chemother* 8: 573-581.
- Smee DF, Sidwell RW, Kefauver D, Bray M and Huggins JW (2002) Characterization of wild-type and cidofovir-resistant strains of camelpox, cowpox, monkeypox, and vaccinia viruses. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 1329-13.
- Smets F and Sokal EM (2002) Epstein-Barr virus-related lymphoproliferation in children after liver transplant: role of immunity, diagnosis, and management. *Pediatr Transplant* 6: 280-7.
- Smets F, Latinne D, Bazin H, Reding R, Otte JB, Buts JP and Sokal EM (2002) Ratio between Epstein-Barr viral load and anti-Epstein-Barr virus specific T-cell response as a predictive marker of posttransplant lymphoproliferative disease. *Transplantation* 73: 1603-10.
- Snoeck R, Andrei G, Gerard M, Silverman A, Hedderman A, Balzarini J, Sadzot-Delvaux C, Tricot G, Clumeck N and De Clercq E (1994) Successful treatment of progressive mucocutaneous infection due to acyclovir- and foscarnet-resistant herpes simplex virus with (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine (HPMPC). *Clin Infect Dis* 18: 570-8.

- Snoeck R, Van Ranst M, Andrei G, De Clercq E, De Wit S, Poncin M and Clumeck N (1995) Treatment of anogenital papillomavirus infections with an acyclic nucleoside phosphonate analogue. *N Engl J Med* 333: 943-4.
- Srivastava T, Zwick DL, Rothberg PG and Warady BA (1999) Posttransplant lymphoproliferative disorder in pediatric renal transplantation. *Pediatr Nephrol* 13: 748-754.
- Stragier I, Snoeck R, De Clercq E, Van Den Oord JJ, Van Ranst M and De Greef H (2002) Local treatment of HPV-induced skin lesions by Cidofovir. *J Med Virol* 67: 241-245.
- Sullivan JL, Byron KS, Brewster FE, Sakamoto K, Shaw JE and Pagano JS (1982) Treatment of life-threatening Epstein-Barr virus infection with acyclovir. *Am J Med* 73: 262-6.
- Sullivan JL, Medveczky P, Forman SJ et al (1984a) Epstein-Barr virus induced lymphoproliferation : implications for antiviral chemotherapy. *N Engl J Med* 311: 1163-1167.
- Sullivan JL, Medveczky P, Forman SJ, Baker SM, Monroe JE and Mulder C (1984b) Epstein-Barr virus induced lymphoproliferation. Implications for antiviral chemotherapy. *N Engl J Med* Nov 311: 1163-7.
- Sumaya CV and Ench Y (1986) Epstein-Barr virus infections in families: The role of children with mononucleosis. *J Inf Dis* 154: 842-850.
- Tao Q and Robertson KD (2003) Stealth technology: how Epstein-Barr virus utilizes DNA methylation to cloak itself from immune detection. *Clin Immunol* 109: 53-63.
- Thorley-Lawson DA, Miyashita EM and Kahn G (1996) Epstein-Barr virus and the B-cell: That's all it takes. *Trends Microbiol* 4: 204.
- Timanovskaya VV, Voedvodin AF, Yakovleva LA, Markarjan DS and Ivanov MT (1988) Malignant lymphomas in rabbits induced by the administration of herpesvirus-containing materials from *Macaca Arctoides* monkeys. *Eksp. Onkol.* 10: 47-51
- Tomkinson B, Robertson E and Kieff E (1993) Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* 67: 2014-2025.
- Torbett BE, Picchio G and Mosier DE (1991) hu-PBL-SCID mice: a model for human immune function, AIDS, and lymphomagenesis. *Immunol Rev* 124: 139-64.
- Torre D and Tambini R (1999) Acyclovir for treatment of infectious mononucleosis: a meta-analysis. *Scand J Infect Dis* 31: 543-7.

- Tsang PC and Samaranayake LP (1999) Oral manifestations of HIV infection in a group of predominantly ethnic Chinese. *J Oral Pathol Med* 28: 122-127.
- Tsurumi T, Daikoku T, Kurachi R and Nishiyama Y (1993a) Functional interaction between Epstein-Barr virus DNA polymerase catalytic subunit and its accessory subunit in vitro. *J Virol* 67: 7648-53.
- Tsurumi T, Kobayashi A, Tamai K, Daikoku T, Kurachi R and Nishiyama Y (1993b) Functional expression and characterization of the Epstein-Barr virus DNA polymerase catalytic subunit. *J Virol* 67: 4651-8.
- Tsurumi T and Nishiyama Y (1994) Further characterization of the interaction between the Epstein-Barr virus DNA polymerase catalytic subunit and its accessory subunit with regard to the 3'-to-5' exonucleolytic activity and stability of initiation complex at primer terminus. *J Virol* 68: 3354-63.
- Tumolowicz JJ (1984). Presence of retrovirus in the B95-8 Epstein-Barr virus-producing cell line from different sources. *In Vitro* 20: 486-492.
- Van Cutsem E, Snoeck R, Van Ranst M, Fiten P, Opdenakker G, Geboes K, Janssens J, Rutgeerts P, Vantrappen G and de Clercq E (1995) Successful treatment of a squamous papilloma of the hypopharynx-esophagus by local injections of (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine. *J Med Virol* 45: 230-5.
- Van Esser JW, van der Holt B, Meijer E, Niesters HG, Trenschele R, Thijsen SF, van Loon AM, Frassonni F, Bacigalupo A, Schaefer UW, Osterhaus AD, Gratama JW, Lowenberg B, Verdonck LF and Cornelissen JJ (2001) Epstein-Barr virus (EBV) reactivation is a frequent event after allogeneic stem cell transplantation (SCT) and quantitatively predicts EBV-lymphoproliferative disease following T-cell-depleted SCT. *Blood* 98: 972-978.
- Van der Horst C, Joncas J, Ahronheim G, Gustafson N, Stein G, Gurwith M, Fleisher G, Sullivan J, Sixbey J and Roland S (1991) Lack of effect of peroral acyclovir for the treatment of acute infectious mononucleosis. *J Infect Dis* 164: 788-92.
- Veronese ML, Veronesi A, D'Andrea E, Del Mistro A, Indraccolo S, Mazza MR, Mion M, Zamarchi R, Menin C and Panozzo M (1992) Lymphoproliferative disease in human peripheral blood mononuclear cell-injected SCID mice. I. T lymphocyte requirement for B cell tumor generation. *J Exp Med* 176(6): 1763-7.
- Wagner HJ, Cheng YC, Liu Z, Gee AP, Heslop HE and Rooney CM (2001a) Monitoring of transplanted patients at risk of Epstein-Barr virus (EBV)-induced lymphoproliferative disorders (LPD) by real time PCR quantification of EBV DNA in peripheral blood [abstract]. *Blood* 98: 480a.

- Wagner HJ, Wessel M, Jabs W, Smets F, Fischer L, Offner G and Bucsky P (2001b) 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* 72: 1012-1019.
- Wagner HJ, Schlager F, Claviez A and Bucsky P (2001c) Detection of Epstein-Barr virus DNA in peripheral blood of paediatric patients with Hodgkin's disease by real-time polymerase chain reaction. *Eur J Cancer* 37:1853-7.
- Wagner HJ, Rooney CM and Heslop HE (2002) Diagnosis and treatment of posttransplantation lymphoproliferative disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 8: 1-8.
- Walker RC, Paya CV, Marshall WF, Strickler JG, Wiesner RH, Velosa JA, Habermann TM, Daly RC and McGregor CGA (1995) Pretransplantation seronegative Epstein-Barr virus status is the primary risk factor for posttransplantation lymphoproliferative disorder in adult heart, lung, and solid organ transplantations. *J Heart Lung Transplant* 14: 214-221.
- Walling DM, Clark NM, Markovitz DM, Frank TS, Braun DK, Eisenberg E, Krutchkoff DJ, Felix DH and Raab-Traub N (1995) Epstein-Barr virus coinfection and recombination in non-human immunodeficiency virus-associated oral hairy leukoplakia. *J Infect Dis* 171: 1122-30.
- Wang D, Liebowitz D and Kieff E (1985) An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transform established rodent cells. *Cell* 43: 831-840.
- Wang F, Tsang, SF, Kurilla MG, Cohen JI and Kieff E (1990a) Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivates latent membrane protein LMP1. *J Virol* 64: 3407-3416.
- Wang F, Gregory C, Sample C, Rowe M, Liebowitz D, Murray R, Rickinson A and Kieff, E (1990b) Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3 C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induces CD23. *J Virol* 64: 2309-2318.
- Wedderburn N, Edwards JM, Desgranges C, Fontaine C, Cohen B and de The G (1984) Infectious mononucleosis-like response in common marmosets infected with Epstein-Barr virus. *J Infect Dis* 150(6): 878-82.
- Werner E, Wolf H, Apodaca J and Zur Hausen H (1975) Lymphoproliferative disease in a cotton-top marmoset after inoculation with infectious mononucleosis-derived Epstein-Barr virus. *Int J cancer* 15: 1000-1008.
- Wildy P and Watson DH (1963) Electron microscopic studies on the architecture of animal viruses. *Spring Harbour Symp Quant Biol.* 27: 25-47.

- Wilmes E, Wolf H, Deinhardt F and Naumann HH (1981) Epstein-Barr virus – a clinically relevant feature of nasopharyngeal carcinoma? *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg)* 60: 4-6.
- Wolf H und Seibl R (1984) Benign and malignant disease caused by EBV. *J Invest Dermatol* 83 (1 Suppl): 88s-95s.
- Wolf H, zur Hausen H and Becker Y (1973) EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cell. *Nature [New Biol.]* 244: 245-247.
- Wolf H, Haus M and Wilmes E (1984) Persistence of Epstein-Barr virus in the parotid gland. *J Virol* 51: 795-798.
- Wutzler P, Spößig M, Hirsch J, Brichacek B, Vonka V, Schindler E, Wuttke K, Rüdiger KD and Wöckel W (1980) Epstein-Barr-Genomnachweis in einem europäischen Burkitt-Lymphom. *Dtsch Med Wochenschr* 105: 961-966.
- Wutzler P, Meerbach A, Färber I, Wolf H and Schreibner K (1995) Malignant lymphomas induced by an Epstein-Barr virus-related herpesvirus from *Macaca arctoides* – a rabbit model. *Arch Virol* 140: 1975-1995.
- Yamamoto M, Kimura H, Hironaka T, Hirai K, Hasegawa S, Kuzushima K, Shibata M and Morishima T (1995) Detection and quantification of virus DNA in plasma of patients with Epstein-Barr virus-associated diseases. *J Clin Microbiol* 33: 1765-8.
- Yakovleva LA, Timanovskaya VV, Voevodin AF, Indzhiya LV, Lapin B, Ivanov MT and Markarjan DS: Modelling of malignant lymphoma in rabbits using oncogenetic viruses of non-human primates. In: Neth R, Gallo RC, Greaves MF and Kabisch H (eds.): *Haematology and Blood Transfusion 31, Modern Trends in Human Leukemia VII*. Springer, Berlin–Heidelberg (1987): S. 445-447.
- Yao QY, Ogan P, Rowe M, Wood M and Rickinson AB (1989) Epstein-Barr virus infected B cells persist in the circulation of acyclovir-treated virus carriers. *Int J Cancer* 43: 67-117.
- Yates J, Warren N, Reisman D and Sudgen B (1984) A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 3806-3810.
- Young LS, Finerty S, Brooks L, Scullion F, Rickinson AB and Morgan AJ (1989) Epstein-Barr virus gene expression in malignant lymphomas induced by experimental virus infection of cottontop tamarins. *J Virol* 63: 1967-74.
- Zimonjic DB, Keck-Waggoner C and Popescu NC (2001) Novel genomic imbalances and chromosome translocations involving c-myc gene in Burkitt's lymphoma. *Leukemia*. 15: 1582-8

- Zhang CX, Decaussin G, Finerty S, Morgan A and Ooka T (1992) Transcriptional expression of the viral genome in the Epstein-Barr virus-induced tamarin lymphoma and the corresponding lymphoblastoid tumour lines. *Virus Res* 26: 153-66.
- Zhang CX, Lowrey P, Finerty S and Morgan AJ (1993) Analysis of Epstein-Barr virus gene transcription in lymphoma induced by the virus in the cottontop tamarin by construction of a cDNA library with RNA extracted from a tumour biopsy. *J Gen Virol* 74 (Pt 3): 509-14.
- Zur Hausen H, Schulte-Holtenhausen H, Klein G, Henle W, Henle G, Clifford P and Santersson L (1970) EBV DNA in biopsies of Burkitt tumors and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature* 228: 1056-1058.

9. Anhang

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. P. Wutzler für die Vergabe des Themas, die Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit und für die optimalen Möglichkeiten, die Untersuchungen im Institut für Virologie und antivirale Therapie durchführen zu können.

Herrn Univ. Prof. Dr. D. Katenkamp danke ich, für die Unterstützung bei der pathohistologischen Begutachtung der Gewebeproben.

Frau Dr. A. Meerbach danke ich für die gute Betreuung und die vielen Hilfestellungen bei der Durchführung der Versuche und dem Erstellen der Arbeit, sowie Frau Prof. I. Färber für ihre kritischen Hinweise und fachlichen Beiträge.

Besonderer Dank gilt dem gesamten Team des Instituts für die Unterstützung bei gemeinsamen Arbeiten und die freundliche Atmosphäre.

Curriculum vitae

Name: Christoph Böttcher
Geburtstag: 29.01.1979
Geburtsort: Erfurt
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1985-1988 POS „Johannes Gutenberg“ in Erfurt
1988-1991 POS „Pablo Neruda“ in Erfurt
1991-1993 Sportgymnasium „Pierre de Coubertin“ in Erfurt
1993-1998 Gymnasium „Königin Luise“ in Erfurt
1995-1996 „Newton Highschool“ in Newton (Kansas/USA)
1998 Abitur

Hochschulausbildung:

10/1998 Beginn Studiums der Humanmedizin an der „Friedrich-Schiller-Universität“ in Jena
07/2000 Physikum
07/2001 1. Staatsexamen
10/2001 Beginn der Promotionsarbeit am Institut für Virologie und antivirale Therapie von Univ. Prof. Dr. med. P. Wutzler unter Anleitung von Dr. med. A. Meerbach
03/2004 2. Staatsexamen
04/2004 Praktisches Jahr (PJ) im Ausland

Erfurt, den

Unterschrift

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der „Friedrich-Schiller-Universität“ bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben:

- Herr Univ. Prof. Dr. med. P. Wutzler
- Frau Dr. med. A. Meerbach

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder eine andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers

Erfurt,

.....