

Aus der Klinik für Innere Medizin C  
Hämatologie und Onkologie  
der Medizinischen Fakultät der  
Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald

**Keine Evidenz für eine Assoziation des Simian Virus 40 mit malignen  
Non-Hodgkin Lymphomen**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

vorgelegt: 2007

von: Sandra Christina Dölken

geboren in: Freiburg i. Br.

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. Kroemer  
1. Gutachter Prof. Dr. med. L. Gürtler (Universität Greifswald)  
2. Gutachter Prof. Dr. med. G. Bauer (Universität Freiburg)  
Ort, Raum: Greifswald, Seminarraum der Klinik für Innere Medizin C  
Tag der Disputation: 27.09.2007, 16.00 Uhr

## **Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt**

### **American Society of Hematology (ASH) in San Diego, USA (2003)**

Schüler, F., S.C. Dölken, C. Hirt, R. Mentel, L.G. Gürtler, G. Dölken: Association between Simian Virus 40 DNA and malignant Lymphoma (Abstr. 4782). Blood 102, 264b (2003)

### **Folgende Publikation wurde veröffentlicht**

Schüler, F., S.C. Dölken, C. Hirt, M.T. Dölken, R. Mentel, L.G. Gürtler, G. Dölken: No evidence for Simian Virus 40 DNA sequences in malignant Non-Hodgkin-Lymphomas. Int. J. Cancer 118, 498 - 504 (2005)



# Inhaltsverzeichnis

## 1 Einleitung

- 1.1 Die Entdeckung des Simian Virus 40 (SV40)
- 1.2 Aufbau des SV40
- 1.3 SV40 und maligne Tumoren bei Tieren und Menschen
- 1.4 Die Rolle des large T-Antigens (T-Ag) und seine Wirkung auf die Wirtszelle
- 1.5 Diskrepante Befunde bei dem Nachweis von SV40 homologen DNA Sequenzen und viralem Protein (T-Ag) mit verschiedenen Methoden
- 1.6 SV40 und seine mögliche Rolle in der Pathogenese maligner Lymphome des Menschen, speziell der Non-Hodgkin Lymphomen (NHL)
- 1.7 Fragestellung und Ziele der Arbeit

## 2 Material und Methoden

- 2.1 Geräte
- 2.2 Reagenzien und Chemikalien
- 2.3 Lösungen
  - 2.3.1 Puffer
  - 2.3.2 Andere Lösungen
- 2.4 Enzyme
- 2.5 Oligonukleotide
- 2.6 Proben von Patienten mit malignen Lymphomen und Kontrollpersonen
  - 2.6.1 Klassifikation der B-Zell Neoplasien
  - 2.6.2 Gewebeproben
  - 2.6.3 Periphere Blut- und Knochenmarksproben
- 2.7 Hochmolekulare DNA aus menschlichen Gewebs- und Blutproben
- 2.8 Zelllinien
- 2.9 Computersoftware
- 2.10 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut (PBMNC)
- 2.11 Isolierung von DNA aus PBMNC
  - 2.11.1 Proteinverdau
  - 2.11.2 Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenol/Chloroform Extraktion
  - 2.11.3 Äthanolpräzipitation von Nukleinsäuren
  - 2.11.4 Spektrophotometrische Quantifizierung der DNA
- 2.12 Oligonukleotide

- 2.12.1 Oligonukleotidsynthese
- 2.12.2 Verwendete Primer und Sonden
- 2.13. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)
  - 2.13.1 Theoretische Grundlagen der TaqMan PCR
  - 2.13.2 PCR Ansatz
  - 2.13.3 Temperatur-Zeit-Protokoll
  - 2.13.4 Quantifizierung von PCR Ergebnissen
- 2.14. Quantitative PCR Methoden zum Nachweis von SV40 DNA (T-Antigen Gen), EBV DNA (BKFR1 - EBNA-1), von t(14;18)-MBR-Translokationen, t(11;14)-Translokationen und klonalen VDJ Genrearrangements in B-Zell Lymphomen
  - 2.14.1 Etablierung einer quantitativen real-time PCR zum Nachweis von SV40
  - 2.14.2 Quantitative real-time PCR für EBV-DNA (BKFR-1 - EBNA-1)
  - 2.14.3 Quantitative real-time PCR zum Nachweis von t(14;18)-MBR-Translokationen
  - 2.14.4 Quantitative real-time PCR zum Nachweis von t(11;14)-Translokationen
  - 2.14.5 Quantitative real-time PCR für das humane K-ras Gen
  - 2.14.6 Quantitative real-time PCR für klonale IgH-VDJ-Genrearrangements in B-Zell Lymphomen
  - 2.14.7 Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen
- 2.15. Agarosegelelektrophorese
  - 2.15.1 Herstellung eines Agarosegels
  - 2.15.2 Vorbereitung der Proben für die Elektrophorese
  - 2.15.3 Durchführung der Elektrophorese
  - 2.15.4 Herstellung von Molekulargewichtsmarkern (pUC18/HpaII)
- 2.16. Herstellung von Plasmid-DNA-Standards für die quantitative real-time PCR (SV40-T-Ag, BKRF-1, t(14;18), t(11;14), K-ras)
  - 2.16.1 Transformation und Selektion rekombinierter Bakterienklone
  - 2.16.2 Durchführung der Klonierung
    - 2.16.2.1 Ligation
    - 2.16.2.2 Transformation und Selektion der positiven Klone
  - 2.16.3 Züchtung der rekombinanten Klone
  - 2.16.4 Präparation und Linearisierung der Plasmid-DNA
- 2.17. Sequenzanalysen
  - 2.17.1 Allgemeines
  - 2.17.2 Sequenzierung der PCR-Produkte

### **3 Ergebnisse**

- 3.1 Etablierung einer quantitativen real-time PCR zum Nachweis von SV40 DNA, Erstellung von Standardkurven
- 3.2 Wiedergewinnung kleiner ds-DNA Moleküle (“episomale virale DNA”) bei der Präparation menschlicher genomischer DNA
- 3.3. SV40 - spezifische PCR Analysen an menschlichen Gewebeproben von malignen Lymphomen und Kontrollen
- 3.4 Elektrophoretische Analyse der Amplifikationsprodukte der SV40-spezifischen PCR mit DNA isoliert aus menschlichen Gewebeproben
- 3.5 SV40 - spezifische PCR Analysen an peripheren Blutproben von Lymphompatienten, in denen zirkulierende Lymphomzellen mit der PCR quantitativ bestimmt worden waren

### **4 Diskussion**

- 4.1 Ergebnisse der SV40-T-Antigen DNA Analysen an menschlichen Blut- und Gewebeproben - methodische Aspekte
- 4.2 Gefahr falsch positiver Ergebnisse aufgrund von Kontaminationen mit SV40 DNA Sequenzen enthaltenden Laborplasmiden
- 4.3 Bedeutung von SV40 in der Ätiologie und Pathogenese von malignen Lymphomen: Wertung der molekularen und serologischen Studienergebnisse

### **5 Zusammenfassung**

### **6 Literatur**

### **7 Appendix**

Danksagung  
Eidesstattliche Erklärung  
Curriculum Vitae





# 1 Einleitung

## 1.1 Die Entdeckung des Simian Virus 40 (SV40)

Das Simian Virus 40 (SV40) ist ein Polyomavirus und gehört zur Familie der Papovaviren. Das natürliche Infektionsreservoir von SV40 sind Rhesus Affen (*Macaca mulatta*) in Nord Indien. Das Virus wurde erstmals 1960 in Nierenzellkulturen von Makaken entdeckt, die latent mit dem Virus infiziert waren (1). Auf diesem Weg gelangte das Virus als Kontamination in verschiedene Polio- und Adenovirus Impfstoffe, die in primären Nierenzellkulturen von Rhesusaffen hergestellt worden waren. Zwischen 1955 und 1963 war ein unbekannter Prozentsatz von 98 Millionen US Amerikanern und Bürgern anderer Länder, die amerikanische Polio- und Adenovirus Impfstoffe importiert hatten (darunter Schweden, Deutschland und die UdSSR) einer möglichen Infektion mit SV40 über kontaminierte Impfstoffe ausgesetzt (2, 3). Sowohl die attenuierte lebende, oral verabreichte Form des Polioimpfstoffes ("Sabin" oder oraler Pockenvirusimpfstoff = OPV) als auch die mit Formaldehyd inaktivierte, injizierbare Form ("Salk" oder IPV) enthielt SV40. Die Konzentration infektiöser Viren war jedoch im IPV deutlich niedriger als im OPV ( $10^{2,3-3,3}$  infektiöse Einheiten/ml versus  $10^{4-6}$  infektiöse Einheiten/ml)(1, 4, 3). Nach experimenteller Inokulation des Virus in menschliche Versuchspersonen fiel die Immunantwort abhängig von dem Infektionsweg unterschiedlich aus: nach oraler Gabe war keine Antikörperbildung gegen SV40 festzustellen, wohingegen nach intranasaler Applikation eine minimale und nach subkutaner Injektion eine mittlere bis hohe Antikörperbildung beobachtet wurde, die für Jahre persistierte (4).

## 1.2. Aufbau des SV40

Das SV40 ist ein kleines DNA-Tumorvirus mit einem icosahedrischen Kapsid und einem Genom aus doppelsträngiger DNA (5). Seine nächsten Verwandten sind zwei Polyomaviren, die vom Menschen isoliert wurden: das JC Virus (JCV) und das BK Virus (BKV). Auf der Ebene der Nukleotidsequenzen weisen diese Polyomaviren eine Homologie von etwa 70% auf, wobei die geringste Ähnlichkeit in den Sequenzen der regulatorischen Regionen zu finden ist. Die großen T-Antigene der Primatenviren sind in ca. 75% ihrer Aminosäuren identisch (6).

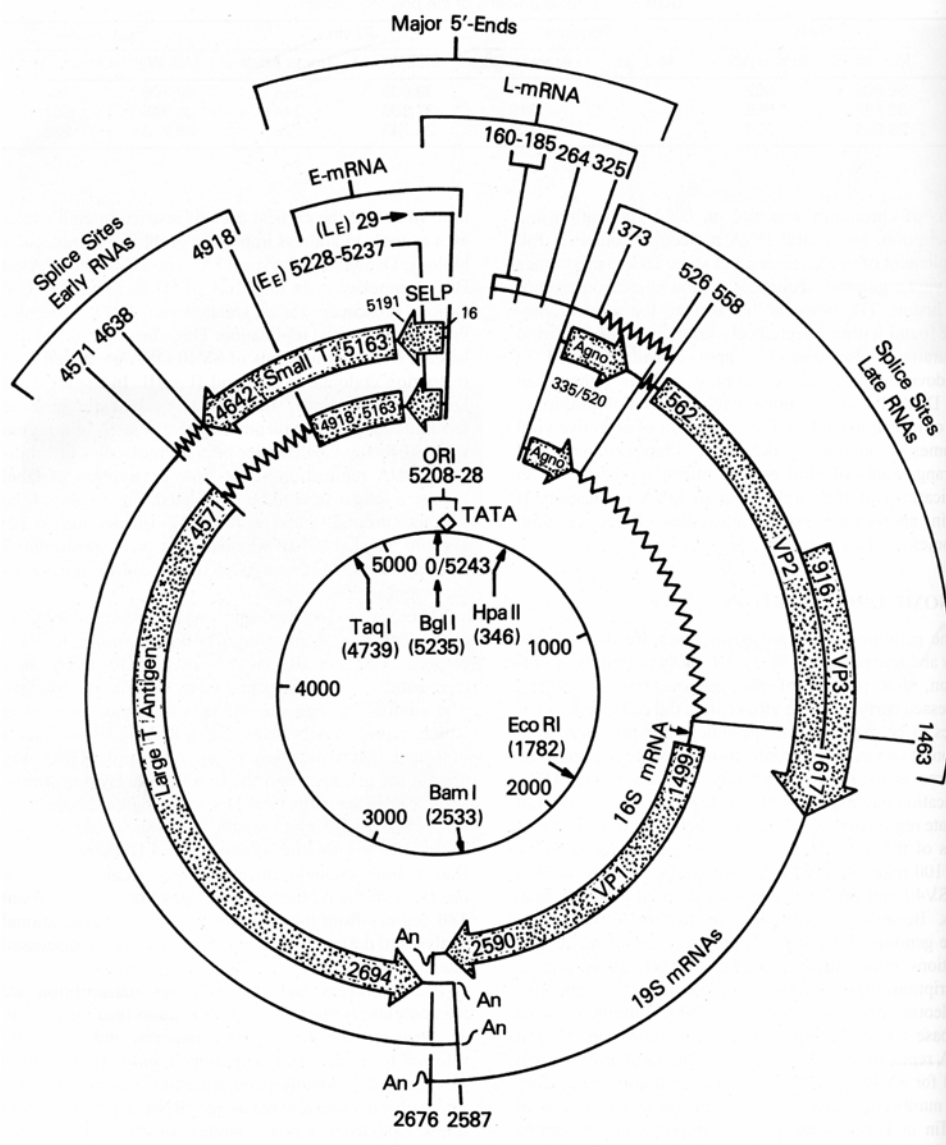
Das SV40 Genom besteht aus kovalent geschlossener, zirkulärer doppelsträngiger DNA (Abb.1). Der Virusreferenzstamm "776" enthält 5243 Basenpaare, von dem andere Virusstämme geringfügig abweichen. Das doppelsträngige SV40 Genom enthält überlappende Gene, die die geringe Menge genetischer Information maximal ausnutzen, sowie eine einzige

regulatorische Region. Der "Origin of Replication" (ORI) liegt in einer nicht-translatierten regulatorischen Region, die ca. 400 Basenpaare umfaßt und Elemente zur Kontrolle der Transkription und Replikation enthält. Die regulatorische Region kann unterteilt werden in den ORI, eine GC reiche Domäne mit einer SP1 Bindungsstelle und Teilen des frühen Promotors (21 bp Repeat Region), eine Enhancer Region mit einem 72 bp Element und eine Region, die den späten Promotor/Initiator enthält. Die drei normalerweise im Labor genutzten Stämme (SV40-776, Baylor, VA45-54) enthalten eine Duplikation des 72 bp Elements ("nonarche-typal"), während frisch von Affengewebe isoliertes Virus (7-9) und Virus von SV40 positiven Tumoren (10) keine Duplikation in der Enhancer Region aufweist ("archetypal"). Eine langsamere und ineffektivere Replikation der viralen "Archetypen" führt möglicherweise aufgrund einer weniger starken Immunreaktion des infizierten Wirts zur Etablierung einer persistierenden Infektion mit SV40. Die Tatsache, daß nur immunsupprimierte Affen nach einer SV40-Infektion Symptome einer Erkrankung aufweisen, unterstützt die Annahme, daß niedergradige oder "schwelende" Infektionen wahrscheinlich durch das Immunsystem des Wirtes kontrolliert werden können. Im Gegensatz dazu führt die Duplikation in der Enhancer Region bei den "Nonarchetypen" zu einer verbesserten Virusproduktion in der Gewebekultur (11). Die beschleunigte Virusproduktion und das Immundefizit des Wirtes ermöglichen es diesen SV40-Stämmen, der Kontrolle durch das Immunsystem zu entgehen.

Das SV40 Genom kann in früh und spät translatierte Regionen unterteilt werden. Die früh translatierten Regionen kodieren für zwei frühe, nichtstrukturelle Proteine, das kleine (t-Ag) und das große T-Antigen (T-Ag), die sich eine gemeinsame N-terminale Region von 82 Aminosäuren teilen und durch alternatives Splicing von viralen Transkripten entstehen. Das wichtigste virale Genprodukt, das große T-Antigen, ist ein nukleäres Phosphoprotein von 708 Aminosäuren. Das T-Antigen wird von zwei Exons kodiert (Nucleotidsequenzen 2691- 4571 und 4918-5163). Es ist ein multifunktionelles Protein, das für die Initiation der viralen DNA-Synthese essentiell ist und Wirtszellen stimuliert in die S-Phase einzutreten und DNA zu synthetisieren. Damit ist das T-Antigen das für die Transformation wohl entscheidendste Protein des SV40 (12 -14). In SV40 infizierten Zellen bildet das T-Antigen mit verschiedenen nukleären Proteinen Komplexe. Besonders wichtig ist seine Bindung an zelluläre Tumorsuppressorproteine (p53 und pRb/p105, p107, pRB2/p130), deren Funktion hierdurch inhibiert wird (15-17).

Die spät translatierten Regionen des SV40 kodieren für drei strukturelle Virusproteine, die Kapsidproteine des Virus und die viralen Protein 1-3 (VP1-3). Das "Major Capsid Protein" (VP1) besteht aus 362 Aminosäuren und bildet pentamere Kapsomere, die die Oberfläche der Viruspartikel bilden.

Von SV40 ist nur ein Serotyp bekannt. Allerdings existieren verschiedene Virusstämme, die an Variationen im Bereich der regulatorischen Regionen und an der Nucleotidsequenz des C-Terminus des Gens des großen T-Antigens erkannt werden können (10). Da kaum genetische Unterschiede zwischen verschiedenen SV40 Stämmen gefunden wurden, wird vermutet, daß die meisten Veränderungen unvorteilhaft für das Virus waren.



**Abb. 1.1:** Übersicht über die genomische Organisation des SV40 (5). Der Origin of Replication ("ORI") und die regulatorischen Regionen befinden sich bei 12:00. Die "frühe Region" erstreckt sich gegen den Uhrzeigersinn, die "späte Region" mit dem Uhrzeigersinn beginnend 12:00. Die für die viralen Proteine kodierenden Regionen sind grau unterlegt. Des weiteren sind die Nukleotidpositionen des 5'- und 3'-Endes der viralen mRNAs und die Position der Introns gekennzeichnet.

### 1.3 SV40 und maligne Tumoren bei Tieren und Menschen

Nach seiner Entdeckung wurde SV40 zu einem beliebten Labormodell, das in vielen molekularbiologischen Studien untersucht wurde. SV40 ist ein sehr potentes DNA-Tumorvirus, das Tumoren in Nagetieren induziert und viele Zelltypen in Zellkultur transformiert, einschließlich menschliche Zellen (18-21). Die natürliche Infektion bei Affen verläuft normalerweise benigne. In immunsupprimierten Tieren kann das Virus jedoch pathogen werden und viele Gewebe infizieren. Experimente an Hamstern haben gezeigt, daß SV40 induzierte Tumoren am häufigsten bei neugeborenen Tieren auftreten und mit hohen Dosen des Virus assoziiert sind. Die meisten Tumoren traten an der Stelle der Inokulation auf. Die intracerebrale Injektion führte zu Ependymomen und anderen Hirntumoren, während die intravenöse Injektion Lymphome und osteogene Sarcome hervorrief (22-24), die intrakardiale oder intrapleurale Injektion führte in 60-100 % der Fälle zu Mesotheliomen (25-27).

SV40 neutralisierende Antikörper wurden auch bei Menschen gefunden, die der Exposition mit SV40-kontaminierten Polio- oder Adenovirus-Vakzinen ausgesetzt waren. Es besteht daher die Möglichkeit, daß SV40 schon immer auch eine natürliche Infektion des Menschen war. Alternativ kann die kontaminierte Poliovakzine die Infektion mit SV40 in die menschliche Population eingebracht haben, die sich dann verbreitete. Stewart et al.(10) führten eine extensive Analyse von SV40 DNA-Sequenzen isoliert von Affen und Menschen durch. Da sich die viralen Genomsequenzen von menschlichem SV40 und "Affen"-SV40 nicht unterschieden - sie wiesen eine 99,5% Sequenzhomologie auf -, kamen sie zu der Schlußfolgerung, daß SV40 im Gegensatz zu der allgemein üblichen Annahme aufgrund seines breiten Wirtsspektrums ein natürliches Infektionsagens von Affe und Mensch sein könnte. Viele Studien an Gewebekulturen haben gezeigt, daß SV40 in menschlichen Zellen repliziert wird, darunter auch in fetalem Gewebe, in Nierenzellen von Neugeborenen und in verschiedenen menschlichen Tumorzelllinien, allerdings schlecht in menschlichen Fibroblasten.

Es gibt viele Berichte über den Nachweis von SV40 DNA und/oder T-Antigen in einer Vielzahl menschlicher Tumoren: in Hirntumoren von Kindern und Erwachsenen (28-31), Pleuramesotheliomen (16, 17, 32-35), bronchopulmonalen Karzinomen (32) und Osteosarkomen (36, 37). Andererseits gibt es aber auch immer wieder Studien mit konsequent negativen Ergebnissen (38, 39). Bemerkenswert ist noch, daß in menschlichen Leukämiezellen keine SV40 DNA und auch keine DNA anderer Polyomaviren von Primaten gefunden wurden (40).

#### **1.4 Die Rolle des large T-Antigens (T-Ag) und seine Wirkung auf die Wirtszelle**

Entscheidend für die Wirkung von SV40 auf Wirtszellen ist das große T-Antigen. Dieses Protein weist drei Aktivitäten auf (14, 15):

- 1) Bindung von pRb, p107 und p130,
- 2) Bindung von p53 und
- 3) eine in der Nähe des Aminoterminus gelegene Funktion, deren zelluläres Zielgen/Protein noch nicht bekannt ist, obwohl diese Funktion mindestens genauso wichtig für das Virus zu sein scheint wie die beiden obengenannten Funktionen.

Die zellulären Zielstrukturen des SV40-T-Antigens sind in Tumorzellen inaktiviert. Dies läßt vermuten, daß SV40 eine wichtige Funktion im Rahmen der Entstehung dieser Tumoren hat. Da die kleinen DNA Tumoviren, zu denen auch SV40 gehört, nur über limitierte genetische Informationen verfügen, sind sie auf die Replikationsfunktionen der Wirtszellen und damit auf die Funktion des großen T-Antigen zur Gewinnung der Kontrolle über den Zellzyklus der Wirtszelle angewiesen.

Die Interaktion des large T-Antigens mit der Rb Proteinfamilie sorgt für den Eintritt der Zellen in die S-Phase (14, 15). In der frühen G1-Phase bindet pRb normalerweise den Transkriptionsfaktor E2F. Wenn pRb durch Cyclin-abhängige Kinasen phosphoryliert wird, wird E2F freigesetzt. E2F führt dann zu einer Expression von Proliferation-stimulierenden Genen, die für den Eintritt der Zelle in die Phase der DNA-Synthese essentiell sind. Das SV40 T-Antigen verursacht eine unregelmäßige Dissoziation des pRb-E2F Komplexes, der aktives E2F freisetzt. Bei diesem Vorgang bindet T-Antigen selektiv an hypophosphoryliertes pRb, das im Gegensatz zur phosphorylierten Form das E2F bindet. Das Wildtyp p53 Protein kann - falls erforderlich - den Zellzyklus unterbrechen und als Antwort auf aberrante Proliferationssignale, DNA-Schäden oder zellulären Stress Apoptose induzieren. Die Bindung von SV40 T-Antigen an p53 hemmt die durch p53 aktivierte Transkription bestimmter Gene sowie apoptotische Prozesse. Das large T-Antigen inaktiviert p53 und erlaubt so den durch E2F stimulierten Zellen den p53-Checkpoint zu umgehen, in die S-Phase einzutreten und zu überleben, um virale DNA zu replizieren.

#### **1.5 Diskrepante Befunde bei dem Nachweis von SV40 homologen DNA Sequenzen und viralem Protein (T-Ag) mit verschiedenen Methoden**

Zwischen 1955 und 1963 waren in den USA, Canada und Europa Millionen von Kindern und Erwachsenen mit Polio- und Adenovirus Vakzinen geimpft worden, die in

unbekanntem Ausmaß mit lebenden SV40 Viren kontaminiert waren. In den folgenden Jahrzehnten gab es Berichte über den Nachweis von SV40 in menschlichen Gewebs- und Blutproben aus Laboratorien der ganzen Welt. Methodische Ansätze waren u.a. die Fusion von Tumorzellen mit permissiven Zellen (41, 42), der direkte Nachweis SV40 homologer DNA-Sequenzen (speziell homolog zum Gen des SV40 T-Antigens) (41-44) oder der direkte Nachweis des SV40 T-Antigens (45-47). Zur selben Zeit gab es jedoch auch Studien mit konstant negativen Ergebnissen (48-51). Die widersprüchlichen Ergebnisse können zum Teil damit erklärt werden, daß Methoden angewandt wurden, die teils nicht sensitiv genug waren, um geringe Mengen von SV40 DNA nachzuweisen, und die teils nicht zwischen SV40 DNA-Sequenzen und den Sequenzen anderer Polypmaviren unterscheiden konnten. Hierzu zählen u.a. Restriktionsenzymanalysen (42), die DNA-DNA Hybridisierung (44), die Southern Blot Hybridisierung (50, 51) und der Nachweis des T-Antigens mit der Immunfluoreszenz (46-49).

Leider brachte auch die Einführung von hochempfindlichen Methoden, die auf der Polymerasekettenreaktion (PCR) beruhen, keine einheitliche Antwort auf die Frage nach einer Assoziation des SV40 mit menschlichen Tumoren. Auch hier kam es zu sehr widersprüchlichen Ergebnissen. Bei menschlichen Hirntumoren fanden einige Autoren bei Kindern eine Assoziation des Virus mit Ependymomen und Choroidplexuspapillomen sowie bei Erwachsenen mit diffusen Astrozytomen, Glioblastomen und Oligodendrogliomen (28-31). Andere Autoren fanden jedoch wiederholt negative Ergebnisse (38, 39). Interessanterweise gehörten 61% der Patienten mit SV40 positiven Hirntumoren einer Altersklasse an, die eine Exposition durch eine mit SV40 kontaminierte Poliovakzine ausschloß, und somit den Verdacht auf eine kontagiöse Transmission von SV40 von Mensch zu Mensch aufwarf (30).

Vergleichbar positive und negative Ergebnisse fand man bei Mesotheliomen (34, 52-54). Aus diesem Grund wurden zwei multizentrische Studien mit dem Ziel durchgeführt, SV40 Sequenzen mit der Polymerasekettenreaktion in Gewebsproben von Mesotheliomen nachzuweisen (55, 56). Die wichtigste Erkenntnis dieser Studien war die fehlende Reproduzierbarkeit positiver Ergebnisse mit DNA, die von menschlichem Lungengewebe und Mesotheliomen isoliert worden war. Kontrollexperimente, in denen hochmolekulare doppelsträngige virale DNA eingesetzt wurde, erbrachten jedoch sehr spezifische und reproduzierbare Ergebnisse (56).

Zusammenfassend läßt sich daher sagen, daß es basierend auf PCR Analysen sowohl Hinweise "für" als auch "gegen" eine Assoziation des SV40 mit einer Reihe von menschlichen Tumoren gibt (57-59). Zusätzlich gibt es auch bis heute noch keine überzeugenden serologischen und epidemiologischen Beweise für einen Zusammenhang

zwischen der SV40-Exposition durch die kontaminierten Impfstoffe und der Inzidenz der menschlichen Tumorarten, die den durch das SV40 Virus in Hamstern induzierten Tumoren entsprechen (60-64).

## **1.6 SV40 und seine mögliche Rolle in der Pathogenese maligner Lymphome des Menschen, speziell der Non-Hodgkin Lymphomen (NHL)**

Die Non-Hodgkin Lymphome (NHL) haben in den letzten 30 Jahren an Häufigkeit zugenommen. Diese Erhöhung der Inzidenz kann nicht allein mit der bei HIV-infizierten Patienten gegenüber HIV-negativen Individuen 300x erhöhten Häufigkeit der NHL erklärt werden. Obwohl keine definitiven Risikofaktoren bekannt sind, wird immer wieder eine virale Ursache postuliert. In diesem Zusammenhang werden auch immer wieder die Polyomaviren genannt, die in Labortieren Tumoren induzieren, aber auch Menschen infizieren können.

In zwei erst kürzlich publizierten Studien aus den USA (65, 66) konnten mit Hilfe von PCR Analysen Sequenzen des SV40 T-Antigens in >40% der Gewebeproben von NHL nachgewiesen werden. Die Analysen nicht-maligner Lymphknoten und peripherer Blutproben von gesunden Freiwilligen, die als Kontrollen dienten, ergaben negative Ergebnisse. Die Autoren sahen diese Befunde als eine mögliche Bestätigung der Hypothese, daß die Impfung mit SV40-kontaminierten Vakzinen eine der Hauptursachen des positiven Nachweises von SV40-DNA (T-Ag) in Gewebeproben von NHL Patienten sei.

In einer großen japanischen Studie waren 11-19% der malignen NHL und etwa 5% der Proben peripherer Blutzellen von gesunden Freiwilligen positiv für SV40 T-Antigen DNA Sequenzen nachgewiesen mit einer PCR-Methode (67). Bezüglich einer möglichen Übertragung des SV40 auf den Menschen in den Jahren um 1960 durch die SV40-kontaminierten Impfstoffe ist es interessant, daß NHL-Gewebeproben von japanischen Patienten, die zwischen 1951 und 1963 geboren worden waren, mit 12% keine höhere Frequenz SV40 positiver NHL Proben aufwiesen, als die NHL-Gewebeproben von Patienten, die vor 1950 (11%) oder nach 1964 (15%) geboren wurden.

In drei früheren Studien in den USA konnte SV40 nur sporadisch, d.h. in 10-15%, in malignen Lymphomen nachgewiesen werden (68, 69), dies führte zu der Vermutung, daß es keine pathogenetische Assoziation zwischen SV40 und malignen Lymphomen gibt. Martini et al.(70) fanden SV40 DNA Sequenzen in etwa 15% der Gewebeproben von Lymphompatienten. Immunhistochemisch konnte die Expression des T-Antigens jedoch nur in 5/18 SV40-DNA positiven Proben nachgewiesen werden. In 3 von 5 Proben waren <1% der Tumorzellen positiv für das SV40 T-Antigen, während reaktive Histiozyten in allen 5

Proben positiv waren.

Zwei europäische Studien konnten mit PCR-Methoden keine SV40 DNA in Gewebeproben von Lymphomen aus Spanien, Italien und Großbritannien nachweisen (71, 72). In einer großen Studie an 250 Hodgkin Lymphomen und 232 NHL aus Canada und Frankreich konnte immunhistochemisch nicht eine einzige SV40 T-Ag-positive Zelle gefunden werden (73).

## **1.7 Ziele der Arbeit**

Ein Ziel der vorgelegten Promotionsarbeit war es, eine quantitative real-time PCR für den Nachweis des Gens, das für das SV40 T-Antigen kodiert, zu etablieren, um so den qualitativen und quantitativen Nachweis von SV40 DNA an peripheren Blutzellen, Knochenmark und lymphatischem Gewebe von Patienten mit malignen Lymphomen und Kontrollpersonen zu führen.

Über einen Vergleich der Ergebnisse der quantitativen PCR-Analysen zirkulierender Lymphomzellen in Blut und im Knochenmark von Patienten mit B- Zell-Lymphomen bestimmt durch den Nachweis Lymphom-spezifischer Translokationen bzw. des klonalen VDJ-Genrearrangements des IgH-Locus und von SV40-Genom-Äquivalenten sollte die Frage einer direkten Assoziation von SV40 mit Tumorzellen maligner Lymphome geklärt werden. Dieser Ansatz basierte auf der Hypothese, daß SV40 in jeder Lymphomzelle nachweisbar sein sollte, falls das Virus eine signifikante Rolle in der Genese des betreffenden malignen Lymphoms hat.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

- Thermocycler für PCR-Analysen:
  - Thermocycler 480, 2400, 9700 (Applied Biosystems, D-64331 Weiterstadt)
  - Sequence Detection System SDS 7700 (Applied Biosystems, D-64331 Weiterstadt)
- Elektrophoreseeinheit:
  - Elektrophoresekammern (Pharmacia Biotech Europe GmbH, D-79111 Freiburg)
  - Gleichspannungsgeräte (Pharmacia Biotech Europe GmbH, D-79111 Freiburg)
- Photoeinheit:
  - Polaroid (Polaroid Corporation, Cambridge, MA, USA)
  - UV-Transluminator (Bachhofer Laboratoriumsgeräte, D-72770 Reutlingen)
- GelDoc 2000 System (Biorad Laboratories GmbH, Hercules, 94547 CA, USA)
- Zentrifugen:
  - Tischkühlzentrifuge (Eppendorf, D-22313 Hamburg)
  - Vakuumzentrifuge (Bachhofer Laboratoriumsgeräte, D-72770 Reutlingen)
  - Zentrifugen mit variabler Temperatureinstellung: Varifuge 1.0, Varifuge 3.0 RS (Haereus Instruments, D-63405 Hanau)
- Spektrophotometer: UltroSpec3 (Pharmacia Biotech Europe GmbH, D-79111 Freiburg)
- Heizblock und Wasserbad:
  - elektronischer Heizblock (Gebrüder Liebisch GmbH, D-33649 Bielefeld)
  - Schüttelwasserbad (Gesellschaft für Labortechnik mbH, D-30927 Burgwedel)
- Überkopfschüttler: (Gesellschaft für Labortechnik mbH, D-30927 Burgwedel)
- Pipetten: Mikropipetten mit variablen Volumina 20 :l, 100 :l, 200 :l, 1000 :l (Gilson Medical Electronics, F-95400 Villiers-le-Bel, France)
- Sequenzanalyse: ABI PRISM Sequence Analyser 310 (Applied Biosystems, D-64331 Weiterstadt)
- Säulen für DNA-Präparation und Aufreinigung
  - Ultrafree® DNA, Millipore (Amicon® Bioseparations)
  - YM-100, Millipore (Amicon® Bioseparations)
  - Centrisep (Princeton Separations)

## 2.2 Reagenzien und Chemikalien

- TaqMan PCR Core Kit mit AmpliTaq Gold™ (Applied Biosystems, D-64331 Weiterstadt)
- Sequenzierreagenzien: Big Dye Terminator Kit (Applied Biosystems, D-64331 Weiterstadt)
- Elektrophorese Reagenzien:
  - Agarose (Sigma - Aldrich Chemie GmbH, D-82041 Deisenhofen)
  - Ethidiumbromid (Sigma - Aldrich Chemie GmbH, D-82041 Deisenhofen)
- Kulturmedien
  - Bacto-Agar (Difco-Laboratories)
  - Bacto-Trypton (Difco-Laboratories)
  - Yeast-Extrakt (Difco-Laboratories)
  - Ampicillin Sodium Salt (Sigma - Aldrich Chemie GmbH, D-82041 Deisenhofen)
  - IPTG [Isopropyl-D-thiogalactopyranosid] (Boehringer, Mannheim)
- X-gal [5-Brom-4-chlor-3-indolyl-3-D-galacopyranosid] (Boehringer, Mannheim)
- Reagenzien für Dichtegradientenzentrifugation
  - Dulbecco-PBS-Puffer (Biochrom KG Seromed)
  - Ficoll Paque (Dichte 1.077 ∇ 0.0001 g/ml) (Pharmacia Biotech Europe GmbH, D-79111 Freiburg)
- Reagenzien für DNA Präparation
  - Phenol (Merck, D-64271 Darmstadt)
  - Chloroform (Merck, D-64271 Darmstadt)
  - Ethanol (Baker; J.T. Baker BV, Deventer Holland)
  - Isoamylalkohol (Baker; J.T. Baker BV, Deventer, Holland)

Weitere Chemikalien wurden von der Sigma - Aldrich Chemie GmbH ( D-82041 Deisenhofen) geliefert und sind unter den einzelnen Methoden aufgeführt.

## 2.3 Lösungen

### 2.3.1 Puffer

<u>TNE-Puffer:</u>	10 mM	Tris-HCl, (pH 8,0)
	100 mM	NaCl

	2 mM	EDTA (pH 8,0)
<u>TBE-Puffer (10x)</u>	890 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	890 mM	Borsäure
	20 mM	EDTA (pH 8,0)

### 2.3.2. Nährböden für Bakterien

<u>TB-Medium:</u> („Terrific Broth“)	12 g	Bacto-Tryptone
	24 g	Yeast-Extrakt
	4 ml	Glycerol
	ad 900 ml H <sub>2</sub> O	
<u>LB -Agar:</u>	10 g	Bacto-Tryptone
	10 g	Yeast-Extrakt
	5 g	NaCl
	15 g	Bacto-Agar
		ad 1 l H <sub>2</sub> O
<u>Bakteriennährboden:</u>	35 ml	LB-Agar
	35 µl	Ampicillin (50 µg/µl)

### 2.3.3 Andere Lösungen

#### Phenollösung:

1 kg Phenol wurde in einem Liter sterilem, warmem H<sub>2</sub>O gelöst. Unter Zugabe von 10 mM Tris-HCl pH 8,0 wurde die Lösung auf pH 8,0 eingestellt und die Phenolphase mit 1g 8-Hydroxychinolin gelb eingefärbt. Zur besseren Phasentrennung wurde 500 ml 2x TNE zugegeben und die Lösung auf 4°C abgekühlt. Nach erfolgter Phasentrennung wurde die obere Phase abgenommen und verworfen, zur unteren Phase erneut 500 ml 2x TNE hinzugegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach erneuter Phasentrennung in Ruhe wurde die obere Phase abgenommen, verworfen, und die Phenollösung mit 500 ml frischen 2x TNE überschichtet.

### Chloroform/Isoamylalkohol:

Chloroform (CHCl<sub>3</sub>) : Isoamylalkohol = 24 : 1 (v/v)

## **2.4 Enzyme**

Alle Enzyme wurden nach Angaben der Hersteller verwendet.

- Ampli-Taq® Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems (D-64331 Weiterstadt))
- Proteinase K (Boehringer Mannheim GmbH, D-68298 Mannheim)
- Restriktionsenzym HpaII (Boehringer Mannheim GmbH, D-68298 Mannheim)
- Restriktionsenzym Hind III (Boehringer Mannheim GmbH, D-68298 Mannheim)

## **2.5. Oligonukleotide**

Die zweifach mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten DNA-Sonden (TaqMan®-Sonden) wurden von der Firma Applied Biosystems (D-64331 Weiterstadt) hergestellt. Alle anderen eingesetzten Oligonukleotide wurden von Herrn Dr. Oppermann, Institut für Biochemie der Universität Greifswald, synthetisiert.

## **2.6. Proben von Patienten und Kontrollpersonen**

### **2.6.1. Klassifikation der B-Zell Neoplasien**

Maligne Lymphome werden in Hodgkin Lymphome und Non-Hodgkin Lymphome, letztere in B- und T-Zell Erkrankungen, eingeteilt. In der neuesten WHO-Klassifikation (74) werden die malignen Lymphome basierend auf zytogenetischen, molekulargenetischen, morphologischen und immunologischen Kriterien in verschiedene Entitäten differenziert. Diese Klassifikationen basiert im Wesentlichen auf der Kiel-Klassifikation (75) und der "Revised European American Lymphoma" (REAL) Klassifikation (76).

## **Tab. 2.1 WHO-Klassifikation der B-Zell Neoplasien (74)**

### Peripheral B-cell Disease

- B-cell chronic lymphatic leukemia/small lymphocytic lymphoma
- B-CLL-Variant: with monoclonal gammopathy / plasmacytoid differentiation
- B-cell prolymphocytic leukemia (PLL)
- Lymphoplasmocytic lymphoma
- Mantle cell lymphoma (MCL), variant: blastic
- Follicular lymphoma (FL) Variants: Grade 1, 2
- Follicular lymphoma (FL) Variant Grade 3
- Cutaneous follicle center lymphoma
- Marginal zone B-cell lymphoma of MALT type
- Nodal marginal zone B-cell lymphoma
- Splenic marginal zone B-cell lymphoma
- Hairy cell leukemia (HCL)
- Plasma cell myeloma/plasmacytoma
- Diffuse large B-cell lymphoma (variants: centroblastic, immunoblastic,
- T-cell or histiocyte rich, anaplastic large cell)
  - Subtype: mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma
  - Subtype: intravascular large B-cell lymphoma
  - Subtype: primary effusion lymphoma
- Burkitt lymphoma (BL) - atypical (pleomorphic) Burkitt Lymphoma

### Precursor B-cell Disease

- Precursor-lymphoblastic leukemia/lymphoma

## **2.6.2. Gewebeproben**

An den Universitätskliniken Freiburg und Greifswald wurden zwischen 1988 und 2002 anlässlich der chirurgischen Entnahme einer diagnostischen Gewebeprobe von Patienten mit Hodgkin und Non-Hodgkin Lymphomen oder anlässlich einer Splenektomie zusätzlich primäres Lymphomgewebe für die immunologische und molekularbiologische Diagnostik gewonnen (**Tab. 2.2**). Der größte Teil des Gewebes wurde für die histologische Untersuchung verwendet. Ein kleiner Teil wurde für molekularbiologische Untersuchungen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -20°C gelagert, ein Teil wurde direkt für immunologische Untersuchungen, d.h. Oberflächenmarker-Analysen an lebenden Zellen, verwendet. Lymphknoten und Milzgewebe wurde von 27 Patienten mit NHL (8 DLCL, 1 BL,

5 FL, 13 niedrig-maligne NHL) und 6 Patienten mit Hodgkin Lymphom gewonnen. Als Kontrollen dienten 4 Lymphknoten mit unspezifischer Entzündung entnommen von Patienten mit HIV-Infektion, 6 Lymphknoten mit histologisch nachgewiesener Metastasierung eines Bronchialkarzinoms (n=3), eines Seminoms (n=1), eines Hypopharynxkarzinoms (n=1) und eines Ösophaguskarzinoms (n=1) sowie 4 Lymphknoten mit histologisch gesicherter benigner follikulärer Hyperplasie (BFH).

**Tab. 2.1 Gewebeproben von Lymphknoten (LK) und Milzgewebe von Patienten mit malignen Lymphomen und anderen Tumoren sowie entzündlichen Erkrankungen als Kontrollen.**

Angaben sind Patienteninitialen, Datum der Entnahme, Alter des Patienten, histopathologische Diagnose und Gewebstyp.

Abkürzungen: DLCL - diffuse large cell lymphoma, BL - Burkitt Lymphom, FL - follikuläres Lymphom, n.m. NHL - niedrig-malignes Non-Hodgkin-Lymphom, PLL - Prolymphozytenleukämie, HCL - Haarzelleukämie, MCL - Mantelzell-lymphom, CLL - chronische lymphatische Leukämie, HL - Hodgkin Lymphom, SCLC - small cell lung cancer, NSCLC - non small cell lung cancer, BFH - benigne follikuläre Hyperplasie.

<b>Initialen</b>	<b>Datum</b>	<b>Alter (Jahre)</b>	<b>Diagnose</b>	<b>Gewebe</b>
<b>H.J.</b>	<b>25.10.88</b>	<b>40</b>	<b>DLCL</b>	<b>LK</b>
<b>W.A.</b>	<b>09.12.88</b>	<b>61</b>	<b>DLCL</b>	<b>LK</b>
<b>F.R.</b>	<b>09.03.899</b>	<b>44</b>	<b>BL</b>	<b>LK</b>
<b>H.E.</b>	<b>17.03.89</b>	<b>49</b>	<b>DLCL</b>	<b>LK</b>
<b>S.H.</b>	<b>04.03.91</b>	<b>41</b>	<b>DLCL (T-Zell)</b>	<b>LK</b>
<b>J.P.</b>	<b>02.03.92</b>	<b>36</b>	<b>DLCL (HIV+)</b>	<b>LK</b>
<b>H.J.</b>	<b>03.10.894</b>	<b>21</b>	<b>DLCL</b>	<b>LK</b>
<b>B.E.</b>	<b>07.03.91</b>	<b>63</b>	<b>DLCL</b>	<b>LK</b>
<b>S.G.</b>	<b>03.03.98</b>	<b>61</b>	<b>DLCL</b>	<b>LK</b>
<b>S.K.</b>	<b>13.12.89</b>	<b>79</b>	<b>FL</b>	<b>LK</b>
<b>H.A.</b>	<b>21.12.89</b>	<b>60</b>	<b>FL</b>	<b>LK</b>
<b>K.M.</b>	<b>12.09.91</b>	<b>43</b>	<b>FL</b>	<b>LK</b>
<b>S.E.</b>	<b>11.05.92</b>	<b>24</b>	<b>FL</b>	<b>LK</b>
<b>H.U.</b>	<b>08.06.94</b>	<b>50</b>	<b>FL</b>	<b>LK</b>
<b>W.M.</b>	<b>03.03.88</b>	<b>58</b>	<b>n.m. NHL</b>	<b>LK</b>
<b>M.F.</b>	<b>13.10.88</b>	<b>67</b>	<b>n.m. NHL</b>	<b>LK</b>
<b>W.J.</b>	<b>31.10.88</b>	<b>55</b>	<b>n.m. T-NHL</b>	<b>LK</b>
<b>S.I.</b>	<b>02.01.89</b>	<b>50</b>	<b>PLL</b>	<b>LK</b>

<b>Initialen</b>	<b>Datum</b>	<b>Alter (Jahre)</b>	<b>Diagnose</b>	<b>Gewebe</b>
<b>S.V.</b>	<b>02.03.89</b>	<b>43</b>	<b>n.m. NHL</b>	<b>Milz</b>
<b>S.B.</b>	<b>15.02.90</b>	<b>80</b>	<b>n.m. NHL</b>	<b>LK</b>
<b>S.T.</b>	<b>16.01.92</b>	<b>51</b>	<b>n.m. NHL</b>	<b>Milz</b>
<b>V.J.</b>	<b>09.12.93</b>	<b>27</b>	<b>n.m. NHL</b>	<b>LK</b>
<b>S.U.</b>	<b>06.12.93</b>	<b>80</b>	<b>n.m. NHL</b>	<b>LK</b>
<b>K.I.</b>	<b>09.11.94</b>	<b>65</b>	<b>n.m. NHL</b>	<b>LK</b>
<b>W.L.</b>	<b>10.11.94</b>	<b>71</b>	<b>n.m. NHL</b>	<b>LK</b>
<b>S.H.</b>	<b>30.10.90</b>	<b>66</b>	<b>HCL</b>	<b>Milz</b>
<b>R.M.</b>	<b>27.02.91</b>	<b>53</b>	<b>CLL</b>	<b>LK</b>
<b>F.A.</b>	<b>13.07.89</b>	<b>31</b>	<b>HL</b>	<b>LK</b>
<b>M.M.</b>	<b>28.02.90</b>	<b>22</b>	<b>HL</b>	<b>LK</b>
<b>D.L.</b>	<b>15.01.89</b>	<b>30</b>	<b>HL</b>	<b>LK</b>
<b>W.M.</b>	<b>29.12.90</b>	<b>18</b>	<b>HL</b>	<b>LK</b>
<b>B.H.</b>	<b>26.03.91</b>	<b>52</b>	<b>HL, Relapse</b>	<b>LK</b>
<b>R.U.</b>	<b>09.05.91</b>	<b>25</b>	<b>HL</b>	<b>LK</b>
<b>S.L.</b>	<b>25.01.89</b>	<b>34</b>	<b>HIV</b>	<b>LK</b>
<b>B.V.</b>	<b>25.04.89</b>	<b>45</b>	<b>HIV</b>	<b>LK</b>
<b>A.A.</b>	<b>16.01.90</b>	<b>31</b>	<b>HIV</b>	<b>LK</b>
<b>H.H.</b>	<b>06.03.92</b>	<b>51</b>	<b>HIV</b>	<b>LK</b>
<b>G.G.</b>	<b>16.02.88</b>	<b>43</b>	<b>Seminom</b>	<b>LK</b>
<b>S.F.</b>	<b>03.01.89</b>	<b>54</b>	<b>Adenocarcinom</b>	<b>LK</b>
<b>R.W.</b>	<b>22.12.88</b>	<b>67</b>	<b>SCLC</b>	<b>LK</b>
<b>K.F.</b>	<b>01.12.88</b>	<b>69</b>	<b>NSCLC</b>	<b>LK</b>
<b>E.G.</b>	<b>30.01.89</b>	<b>59</b>	<b>Hypopharynxca.</b>	<b>LK</b>
<b>M.T.</b>	<b>26.09.89</b>	<b>62</b>	<b>Ösophagusca. Cancer</b>	<b>LK</b>
<b>Z.L.</b>	<b>23.01.89</b>	<b>63</b>	<b>BFH</b>	<b>LK</b>
<b>D.H.</b>	<b>21.01.92</b>	<b>29</b>	<b>BFH</b>	<b>LK</b>
<b>W.H.</b>	<b>12.03.92</b>	<b>51</b>	<b>BFH</b>	<b>LK</b>
<b>B.F.</b>	<b>19.01.93</b>	<b>21</b>	<b>BFH</b>	<b>LK</b>

### 2.6.3. Periphere Blut- und Knochenmarksproben

Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (PBMNC) und Knochenmark (KM) wurden von 48 Patienten mit malignem NHL gewonnen (**Tab. 2.3**). Diese Patienten waren nicht mit denen identisch, von denen wir die in Tab. 2.2. aufgelisteten Gewebeproben erhalten hatten. Diese Proben waren zwischen 1992 und 2002 von Patienten, die in den Universitätskliniken Freiburg und Greifswald behandelt wurden, im Rahmen klinischer Studien gewonnen worden. In diesen Studien wurden minimale zirkulierende Lymphomzellen mit PCR-Methoden nachgewiesen und quantifiziert. 22 PBMNC und 7 KM Proben wurden von Patienten mit FL gewonnen, 9 von Patienten mit MCL, 3 mit CLL und 1 Probe von einem Patienten mit einer HCL. Die mononukleären Zellen waren über Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll-Hypaque, Pharmacia, Freiburg) isoliert und bei -20°C gelagert worden.

PBMNC von 47 gesunden Spendern (**Tab.2.4**) dienten als Kontrollen.

**Tab. 2.3 Mononukleäre Zellfraktionen isoliert aus peripherem Blut (PBMNC) und Knochenmark (KM) von Patienten mit malignen Lymphomen.**

Angegeben sind Patienteninitialen, Datum der Entnahme, Alter, histopathologische Diagnose und die Zellfraktion isoliert aus peripherem Blut oder Knochenmark.

Abkürzungen: CLL - chronische lymphatische Leukämie, FL - folliculäres Lymphom, MCL - Mantelzellymphom).

<b>Initialen</b>	<b>Datum</b>	<b>Alter (Jahre)</b>	<b>Diagnose</b>	<b>Gewebe</b>
<b>K.R.</b>	<b>08.07.99</b>	<b>51</b>	<b>CLL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>A.H.</b>	<b>10.01.00</b>	<b>61</b>	<b>CLL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>B.J.</b>	<b>19.01.93</b>	<b>65</b>	<b>CLL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>G.D.</b>	<b>19.11.92</b>	<b>36</b>	<b>FL</b>	<b>KM</b>
<b>K.M.</b>	<b>06.02.95</b>	<b>50</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>M.R.</b>	<b>16.07.92</b>	<b>48</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>M.C.</b>	<b>18.06.91</b>	<b>43</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>G.G.</b>	<b>08.10.90</b>	<b>53</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>S.M.</b>	<b>01.08.91</b>	<b>61</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>R.M.</b>	<b>23.09.93</b>	<b>74</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>G.H.</b>	<b>18.09.92</b>	<b>49</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>R.K.</b>	<b>08.01.02</b>	<b>69</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>S.M.</b>	<b>09.11.00</b>	<b>64</b>	<b>FL</b>	<b>KM</b>



<b>T.J.</b>	<b>03.02.00</b>	<b>50</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>U.V.</b>	<b>08.09.00</b>	<b>46</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>V.D.</b>	<b>17.12.01</b>	<b>49</b>	<b>FL</b>	<b>KM</b>
<b>V.R.</b>	<b>05.10.00</b>	<b>60</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>W.E.</b>	<b>31.05.01</b>	<b>45</b>	<b>FL</b>	<b>KM</b>
<b>Z.C.</b>	<b>19.08.99</b>	<b>60</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>L.K.</b>	<b>22.01.02</b>	<b>71</b>	<b>FL</b>	<b>KM</b>
<b>S.A.</b>	<b>13.03.01</b>	<b>60</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>L.E.</b>	<b>15.12.92</b>	<b>40</b>	<b>FL</b>	<b>KM</b>
<b>H.C.</b>	<b>14.04.99</b>	<b>51</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>E.S.</b>	<b>22.12.99</b>	<b>71</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>H.K.</b>	<b>06.03.00</b>	<b>70</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>P.B.</b>	<b>05.10.00</b>	<b>53</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>A.A.</b>	<b>24.11.00</b>	<b>52</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>M.I.</b>	<b>08.03.01</b>	<b>51</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>B.S.</b>	<b>10.04.01</b>	<b>43</b>	<b>FL</b>	<b>KM</b>
<b>B.G.</b>	<b>17.04.01</b>	<b>62</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>B.L.</b>	<b>01.08.01</b>	<b>38</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>K.B.</b>	<b>12.09.01</b>	<b>60</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>O.B.</b>	<b>27.05.02</b>	<b>52</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>G.H.</b>	<b>27.09.02</b>	<b>54</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>G.L.</b>	<b>24.10.02</b>	<b>63</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>G.A.</b>	<b>23.12.02</b>	<b>65</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>K.B.</b>	<b>26.04.99</b>	<b>57</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>B.J.</b>	<b>25.03.99</b>	<b>63</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>P.M.</b>	<b>18.10.02</b>	<b>68</b>	<b>MCL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>S.F.</b>	<b>11.12.00</b>	<b>53</b>	<b>MCL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>B.M.</b>	<b>02.05.01</b>	<b>71</b>	<b>MCL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>G.L.</b>	<b>17.04.01</b>	<b>55</b>	<b>MCL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>B.I.</b>	<b>28.12.01</b>	<b>48</b>	<b>MCL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>F.E.</b>	<b>07.03.02</b>	<b>63</b>	<b>MCL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>L.F.</b>	<b>08.07.02</b>	<b>71</b>	<b>MCL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>D.K.</b>	<b>07.10.97</b>	<b>50</b>	<b>MCL</b>	<b>PBMNC</b>
<b>S.H.</b>	<b>08.02.99</b>	<b>69</b>	<b>MCL</b>	<b>PBMNC</b>

**Tab. 2.4 Mononukleäre Zellfraktionen isoliert aus peripherem Blut (PBMNC) von gesunden Freiwilligen.**

Angegeben sind Patienteninitialen, Datum der Entnahme, Alter, histopathologische Diagnose und die Zellfraktion isoliert aus peripherem Blut oder Knochen-mark

Die Proben B.A. (19.5.04) und B.S. (5.3.91) stammten von Patienten mit einer frischen EBV-assoziierten infektiösen Mononukleose (IM) (grau unterlegt).

<b>Initialen</b>	<b>Datum</b>	<b>Alter (Jahre)</b>	<b>Diagnose</b>	<b>Gewebe</b>
P.S.	30.4.04	28	Kontrolle	PBMNC
R.A.	30.4.04	21	Kontrolle	PBMNC
H.S.	11.5.04	31	Kontrolle	PBMNC
D.J.	11.5.04	22	Kontrolle	PBMNC
H.N.	11.5.04	23	Kontrolle	PBMNC
K.S.	11.5.04	22	Kontrolle	PBMNC
B.C.	11.5.04	21	Kontrolle	PBMNC
G.K.	12.5.04	24	Kontrolle	PBMNC
M.M.	13.5.04	29	Kontrolle	PBMNC
N.K.	13.5.04	23	Kontrolle	PBMNC
D.S.	17.5.04	22	Kontrolle	PBMNC
B.C.	17.5.04	22	Kontrolle	PBMNC
G.A.	17.5.04	23	Kontrolle	PBMNC
B.A.	19.5.04	27	Kontrolle	PBMNC
G.G.	21.6.04	86	Kontrolle	PBMNC
K.D.	26.2.04	31	Kontrolle	PBMNC
P.U.	14.11.03	34	Kontrolle	PBMNC
B.S.	5.3.91	18	Kontrolle	PBMNC
H.K.	7.5.99	20	Kontrolle	PBMNC
L.L.	10.5.00	26	Kontrolle	PBMNC
M.L.	17.7.00	19	Kontrolle	PBMNC
M.W.	17.1.01	72	Kontrolle	PBMNC
W.P.	12.3.01	31	Kontrolle	PBMNC
I.F.	22.3.01	84	Kontrolle	PBMNC
B.S.	27.3.01	26	Kontrolle	PBMNC
S.M.	25.4.01	71	Kontrolle	PBMNC
S.M.	27.4.01	91	Kontrolle	PBMNC

<b>L.G.</b>	<b>2.5.01</b>	<b>79</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>PBMNC</b>
<b>M.W.</b>	<b>18.7.01</b>	<b>73</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>PBMNC</b>
<b>B.M.</b>	<b>30.7.01</b>	<b>24</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>PBMNC</b>
<b>Z.M.</b>	<b>15.8.01</b>	<b>19</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>PBMNC</b>
<b>F.D.</b>	<b>27.8.01</b>	<b>21</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>PBMNC</b>
<b>B.C.</b>	<b>12.10.01</b>	<b>23</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>PBMNC</b>
<b>C.P.</b>	<b>3.12.01</b>	<b>27</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>PBMNC</b>
<b>P.K.</b>	<b>9.1.02</b>	<b>25</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>PBMNC</b>
<b>A.R.</b>	<b>11.7.02</b>	<b>21</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>PBMNC</b>
<b>S.R.</b>	<b>28.3.03</b>	<b>23</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>PBMNC</b>
<b>W.P.</b>	<b>8.4.03</b>	<b>33</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>PBMNC</b>
<b>S.F.</b>	<b>28.5.03</b>	<b>18</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>PBMNC</b>
<b>S.F.</b>	<b>25.6.03</b>	<b>18</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>PBMNC</b>
<b>A.F.</b>	<b>24.7.03</b>	<b>33</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>PBMNC</b>
<b>W.T.</b>	<b>4.11.03</b>	<b>25</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>PBMNC</b>
<b>D.C.</b>	<b>25.11.03</b>	<b>19</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>PBMNC</b>
<b>S.S.</b>	<b>2.4.04</b>	<b>27</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>PBMNC</b>
<b>M.G.</b>	<b>5.4.04</b>	<b>22</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>PBMNC</b>
<b>C.M.</b>	<b>17.6.04</b>	<b>28</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>PBMNC</b>
<b>S.S.</b>	<b>8.7.04</b>	<b>31</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>PBMNC</b>

## **2.7. Hochmolekulare DNA aus menschlichen Gewebs- und Blutproben**

Sofern die isolierten Blutzellen in früheren Studien bereits auf t(14;18)-positive Zellen, t(11;14)-positive Zellen oder Zellen mit Lymphom-spezifischem IgH-VDJ-Rearrangement untersucht worden waren, stand aus diesen Proben isolierte hochmolekulare DNA zur Verfügung, die bei -20°C gelagert worden war. Ansonsten wurde die DNA nach der in **2.10** beschriebenen Methode präpariert.

## **2.8. Zelllinien**

Die EBV-positiven Zelllinien Ly 65, P3H3, Ly 67, Daudi, BL 41, Raji und die EBV-negativen Zelllinien Ramos, BJA-B, Molt 4 und K562 wurden von George Klein (Inst. for Tumor Biology, Karolinska Institute, Stockholm, Schweden) zur Verfügung gestellt.

Die t(14;18)-MBR positive Zelllinie Karpas 422 war uns von Dr. A. Karpas (University of Cambridge, Cambridge, UK) zur Verfügung gestellt worden (77). Die DNA dieser Zelllinie und das klonierte Amplifikationsfragment wurden als Positivkontrollen in der t(14;18)-PCR eingesetzt.

## **2.9. Computersoftware**

Die Sequenzanalysen wurden mit Hilfe des Programms „DNASIS“ (Hitachi) und den Genbanken „Genebank“ und „EMBL“ (Pharmacia) durchgeführt. Die Auswahl der PCR Primer und Sonden erfolgte mit Hilfe der Analysesoftware „Oligo“ (National Bioscience, Inc, Plymouth, MN, USA) und „Primer Express 1.0“ (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland). Für die quantitative PCR Auswertung stand „GraphPad Prism 3.0“ (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) zur Verfügung. Die mit „GelDoc 2000“ (Biorad) eingescannten Elektrophoresegele wurden mit der Analysesoftware „Quantity One“ (BioRad) weiter bearbeitet. Für die Erstellung dieser Arbeit wurden „Word Perfect 2000“, „Corel Draw 9.0“ und „Quatro Pro 9.0“ (Corel) verwendet.

## **2.10 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut (PBMNC)**

Die Isolierung der mononukleären Zellen aus peripherem Blut erfolgte mit der Dichtegradienten-Zentrifugation. Blut wurde im Verhältnis 1:2 (v/v) mit PBS-Dulbecco-Puffer (PBS) gemischt und auf gleichem Volumen Ficoll-Paque vorsichtig überschichtet. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 900 g wurde die Interphase mit den mononukleären Zellen vorsichtig abpipettiert und zwei mal mit PBS gewaschen. Nach Resuspension in einem kleinen Volumen PBS (0,5 - 1 ml) folgte die Zählung in der Neubauer Zählkammer, Aufteilung in Portionen zu je  $1-2 \times 10^7$  Zellen und Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **2.11 Isolierung von DNA aus PBMNC**

### **2.11.1 Proteinverdau**

$1 \times 10^7$  Zellen wurden in 1 ml TNE und 0,5% SDS aufgenommen. SDS zerstört die Zellmembran und macht die Proteine der Zellen für Proteinase angreifbar. Der Proteinverdau erfolgte mit 500  $\mu\text{g/ml}$  Proteinase K (Boehringer Mannheim) bei  $65^{\circ}\text{C}$  im Schüttelwasserbad für mindestens 3h, gewöhnlich jedoch über Nacht.

### **2.11.2 Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenol/Chloroform Extraktion**

Nach dem Proteinverdau wurde die wäßrige Lösung mit einem gleichem Volumen Tris-HCl gepuffertem Phenol versetzt, im End-über-End Schüttler für 10 Minuten gut durchmischt und anschließend zur Phasentrennung in der Heraeus-Zentrifuge für 10 min bei 14.000 g und 4°C zentrifugiert. Neben der wäßrigen, DNA-haltigen Oberphase bildet sich eine dichtere Phenolphase und eine Interphase aus, in der sich Proteine und Polysaccharide befinden. Die Oberphase wurde vorsichtig abgenommen und der Vorgang mit Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol 1:2 (v/v) wiederholt. Zur Entfernung verbliebener Phenolreste wurde die Chloroformextraktion mit reinem Chloroform / Isoamylalkohol wiederholt.

### **2.11.3 Äthanolpräzipitation von Nukleinsäuren**

Bei hohen Salzkonzentrationen sind Nukleinsäuren in Äthanol unlöslich. Diese Eigenschaft wird ausgenutzt, um Nukleinsäurelösungen zu konzentrieren oder den Lösungspuffer zu wechseln. Die wässrige Nukleinsäurelösung wurde auf 0,4 M Lithiumchlorid eingestellt und mit 2,5-fachem Volumen eiskalten (-20°C) 100% Äthanol versetzt. Nach mehrmaligem Überkopfschütteln fällt die DNA aus und kann mit einer über einer Bunsenbrennerflamme zu einem Häkchen gebogenen sterilen Pasteurpipette „aufgespult“ werden. Das „Abspülen“ der an der Pipettenspitze anhaftenden DNA mit 1 ml 70% eiskaltem Äthanol dient der Entfernung überschüssigen Salzes. Nach dem Verdunsten des Äthanol konnte die hochmolekulare DNA in 100-400 µl sterilem, destilliertem H<sub>2</sub>O gelöst werden. Das Erhitzen der Proben auf 65°C für eine Stunde diente der Inaktivierung eventuell noch in der Lösung vorhandener DNAsen.

Gegenüber anderen Präparationsmethoden über DNA bindende Materialien oder einer Säulentrennung hat die Methode des „DNA-Häckelns“ den Vorteil, daß nur hochmolekulare DNA isoliert wird. Da mit dieser Methode stark degradierte DNA und Nukleotide nicht isoliert werden, läßt sich die einer bestimmten hochmolekularen DNA Menge korrespondierende Zellzahl über die photometrische Bestimmung der DNA bei 260 nm recht exakt bestimmen.

#### 2.11.4 Spektrophotometrische Quantifizierung der DANN

DNA hat die Eigenschaft UV-Licht bei einer Wellenlänge zwischen 260 und 280 nm zu absorbieren, das Absorptionsmaximum liegt bei 260 nm. Mit einem Photometer kann die optische Dichte (OD) einer DNA-Lösung im Ultraviolettbereich bei 260 nm und 280 nm bestimmt werden. Hierbei wird davon ausgegangen, daß eine OD<sub>260</sub> von 1,000 etwa 50 µg hochmolekularer doppelsträngiger DNA oder 33 µg einzelsträngiger DNA (z.B. für Primer) entsprechen. Der Quotient OD<sub>260</sub> / OD<sub>280</sub> stellt ein Maß für die Reinheit der DNA-Lösung dar, er sollte in einem Bereich zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Niedrigere Werte zeigen eine Verunreinigung der Lösung mit Proteinen oder Phenol an, die eine exakte spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung unmöglich machen und die PCR Amplifikation hemmen können. Zur Konzentrationsbestimmung wurde 500 µl einer 100-fach verdünnten DNA-Lösung gegen das gleiche Volumen Verdünnungsmedium (hier H<sub>2</sub>O) gemessen.

#### 2.12 Oligonukleotide

In dieser Arbeit wurden Oligonukleotide als Primer und Sonden eingesetzt.

##### 2.12.1 Oligonukleotidsynthese

Die Primer für die Polymerase Kettenreaktion (**siehe Tab. 2.5**) wurden von Dr. Oppermann (Institut für Biochemie der Universität Greifwald) synthetisiert. Die Synthese erfolgte mit einem Oligonucleotide Synthesizer Model 380A (Applied Biosystems, Weiterstadt) in einem Synthesemaßstab von 0,2 µmol, gefolgt von einer Aufreinigung und Entsalzung der Primer mittels Gelfiltration und anschließender Lyophilisierung. Die lyophilisierten Primer wurden in 200 µl H<sub>2</sub>O gelöst und 1:500 verdünnt für die photometrische Konzentrationsbestimmung eingesetzt. Die Einstellung erfolgte auf eine Konzentration von 20 µM.

### 2.12.2 Verwendete Primer und Sonden

Die in dieser Arbeit für PCR Analysen verwendeten Primer und Sonden sind in **Tab.2.5** aufgeführt. Nur bei dem Nachweis des SV40-T-Antigen-Gens wurde eine "(6-FAM) minor groove binder probe (MGB-probe)" verwendet, ansonsten zweifach Fluoreszenz-markierte DNA Sonden (markiert mit FAM und TAMRA), die von der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt, Germany) synthetisiert worden waren.

**Tab. 2.5 Für PCR Analysen verwendete Primer und Sonden**

	Sequenz (5' -> 3')	GenBank Nr. / Position
<b>SV40</b>		NC_001669.1
PCR Fragment	111 bp	4439 - 4549
5'-Primer	TTGGAGGAGTAGAATGTTGAGAGTCA	4439 - 4464
Sonde	CTTTAATGAGGAAAACCTGT	4508 - 4527
3'-Primer	AATGGGAGCAGTGGTGGAAAT	4530 - 4549
<b>EBV</b>		V01555.1
PCR Fragment	74 bp	109708 - 109781
5'-Primer	CCCGCTCCTACCTGCAATATC	109708 - 109728
Sonde	GGAAACCAGGGAGGCAAATC	109733 - 109758
3'-Primer	TGACTGTGTGCAGCTTTGACGATGGA	109762 - 109781
<b>K-ras</b>		L00045
PCR Fragment	146 bp	111 - 256
5'-Primer	CTTGTGGTAGTTGGAGCT	111 - 128
Sonde	AAGAGTGCCTTGACGATACAGC	141 - 162
3'-Primer	GCAGGACCATTCTTTGAT	239 - 256
<b>klonale IgH-VDJ-Rearrangements</b>		
PCR Fragment	Klon-spezifische Fragmente von ca. 180 bp	

VH1 Primer	CACAGAAGTTCCAGGGCAG	
VH2 Primer	CAGGCTCACCATCTCAA	
VH3 Primer	TTCACCATCTCCAGAGACAA	
VH4 Primer	CAACCCGTCCTCAAGAGTC	
VH5 Primer	TACAGCCCGTCCTTCCAAG	
VH6 Primer	ATTATGCAGTATCTGTGAAAAGT	
JH-Konsensus Primer	ACCTGAGGAGACGGTGAC	
VH1 Sonde	AGATCTCAGGCTGCTCAGCTCCATGT	
VH2 Sonde	TGTCCACAGGGTCCATGTTGGTCA	
VH3 Sonde	CGTGTCTCGGCTCTCAGGCTGTT	
VH4 Sonde	ACAGAGCTCAGCTTCAGGGAGAACTGGT	
VH5 Sonde	CCTTCAGGCTGCTCCACTTCAGGTA	
VH6 Sonde	TGTGTCTGGGTTGATGGTTATTCG	
<b>t(14;18)-MBR</b>		
PCR Fragment	Klon-spezifische Fragmente von 100-300 bp	
5'-Primer	TGGTGGTTTGACCTTTAGAGA	
Sonde	CTCTGGGTGGGTCTGTGTTGAAACA	
JH-Konsensus Primer	ACCTGAGGAGACGGTGAC	
<b>t(11;14)</b>		
PCR Fragment	Klon-spezifische Fragmente von 180-300 bp	
5'-Primer	GATAAAGGCGAGGAGCAT	
Sonde	TAACCGAATATGCAGTGCAGCAATT	
JH-Konsensus Primer	ACCTGAGGAGACGGTGAC	



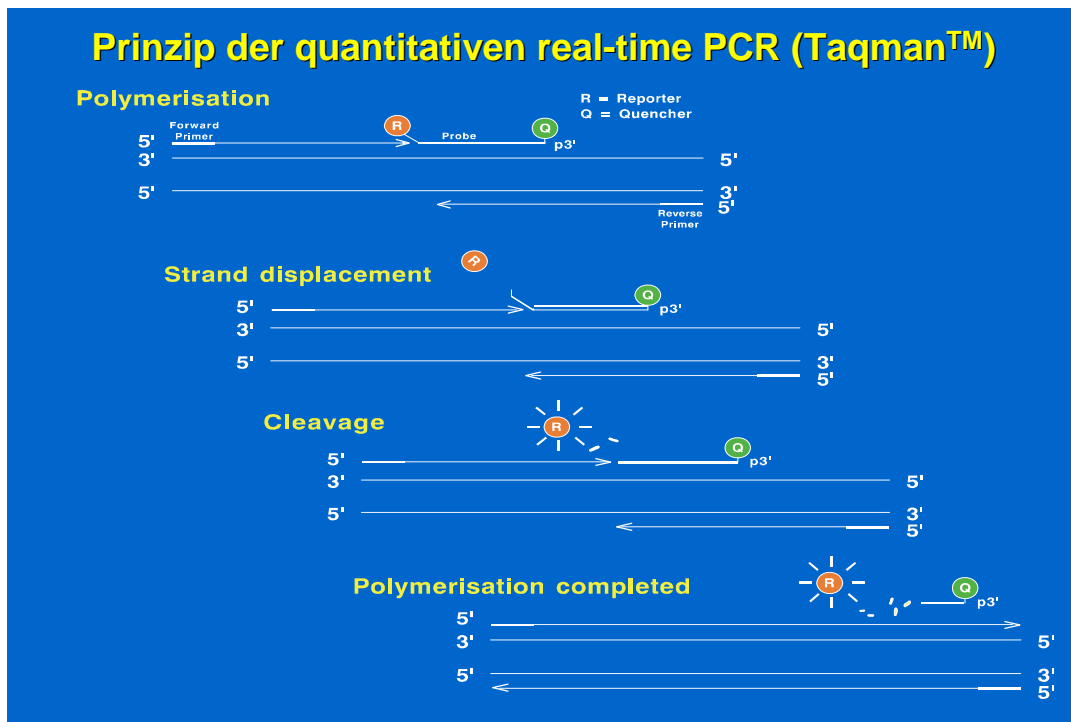
## 2.13 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

### 2.13.1 Theoretische Grundlagen der TaqMan<sup>R</sup>-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde 1985 erstmals beschrieben. Mit dieser Methode wird ein kurzer DNA-Abschnitt *in vitro* exponentiell vervielfacht (amplifiziert), so daß er anschließend leicht mit den Standardmethoden der Agaroseelektrophorese und der Southern Blot Hybridisierung nachgewiesen werden kann (78). Mit dieser Amplifikation kann eine sehr hohe Sensitivität - bis hin zum Nachweis einzelner Nukleinsäuremoleküle - erreicht werden. Initial wurde als DNA-Polymerase das Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I eingesetzt, die nach jedem Erhitzen auf  $>95^{\circ}\text{C}$  erneut zugegeben werden mußte. Die Methode konnte durch den Einsatz hitzestabiler Taq-Polymerasen ganz wesentlich verbessert werden (79). Die hitzestabile DNA-Polymerase wurden aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq) gewonnen und übersteht kurzzeitiges Erhitzen auf  $95^{\circ}\text{C}$  ohne größere Aktivitätsverluste. So wurde eine Automatisierung der PCR möglich.

Die PCR basiert auf einer enzymatischen Vervielfältigung eines DNA-Fragmentes, das durch zwei Oligonukleotide (Primer), die nach Denaturierung mit den gegenüberliegenden Strängen der "Target"-Sequenz (Ziel) hybridisieren, flankiert wird. Die Primer sind mit ihren 3'-Enden einander zugewandt. Wiederholte Zyklen von Hitzedenaturierung ("melting" = Trennung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen der Komplementärstränge) der zellulären und später der synthetisierten DNA, spezifische Bindung der Primer an die Komplementärsequenz ("annealing") und eine von den Primern ausgehende DNA-Synthese durch die Taq-DNA-Polymerase ("extension", Verlängerung der Primer) führt zur Amplifikation von DNA-Fragmenten definiert durch die 5' Enden der Primer. Jedes Syntheseprodukt eines Primers dient dem anderen Primer im nächsten Zyklus als homologe Zielsequenz. Dies führt zu einer Verdoppelung der DNA-Fragmente in jedem Zyklus. So resultiert eine exponentielle Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Fragmentes.

Erst mit den von Lee et al. (80) bei Applied Biosystems entwickelten, mit Fluoreszenz-farbstoffen markierten, sogenannten "fluorogenen" Sonden wurde es möglich, den Abbau von DNA-Sonden ohne aufwendige Analysen noch während der PCR-Amplifikation, also in "real-time" quantitativ zu erfassen. Der TaqMan<sup>®</sup> PCR-Test basiert auf einem 5',3'-Nuclease-Assay. Es werden zweifach-markierte, fluorogene DNA-Sonden (TaqMan<sup>®</sup>-Sonden) verwendet, die am 5'- Ende einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluoreszeinderivat, z.B. FAM) und am 3'- Ende einen Quencher-Farbstoff (Rhodaminderivat, z.B. TAMRA) tragen (**Abb. 2.1**). Das 3'-Ende des Oligonukleotids wird mit einem Phosphatrest blockiert, damit die Sonde der DNA-Polymerase nicht als Primer dienen kann. Wird die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) zur Fluoreszenz angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt (81). Während der PCR lagert sich die Sonde an den Matrizen-Strang an eine homologe Sequenzregion zwischen den beiden Primern an. In der Extensionsphase trifft die Taq-DNA-Polymerase auf die gebundene Sonde und spaltet diese mittels ihrer 5',3'-Exonukleaseaktivität Schritt für Schritt mit fortschreitender DNA-Synthese, bis die Bindungskräfte zwischen Sonde und Matrize so gering werden, daß sich die Sonde vom Matrizenstrang ablöst. Freie, nicht-hybridisierte Sonde wird nicht hydrolysiert. Durch die Hydrolyse der Sonde wird der Reporter vom Quencher getrennt und die Reporterfluoreszenz kann nicht mehr auf den Quencher übertragen werden. Pro synthetisierten DNA-Strang wird ein Reportermolekül freigesetzt. Die Fluoreszenz des Reporters steigt entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkten stöchiometrisch mit jedem PCR-Zyklus an. Die Veränderung der Fluoreszenz der verschiedenen Farbstoffe wird in geschlossenen Reaktionsgefäßen Zyklus für Zyklus mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequence Detection System in "real time" bestimmt.



**Abb. 2.1:** Prinzip der quantitativen real-time PCR (TaqMan<sup>R</sup>)

Es werden zweifach-markierte, fluorogene DNA-Sonden (TaqMan<sup>®</sup>-Sonden) verwendet, die am 5'-Ende einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (ein Fluoreszeinderivat, z.B. FAM) und am 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (ein Rhodaminderivat, z.B. TAMRA) tragen. Die Taq-DNA-Polymerase kann parallel zur Synthese mit ihrer Nukleaseaktivität die Sonde hydrolysieren, so daß der Reporter (R - rot) vom Quencher (Q - grün) getrennt wird und die Reporterfluoreszenz nicht mehr auf den Quencher übertragen werden kann. Die Reporterfluoreszenz steigt entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkten stöchiometrisch mit jedem PCR-Zyklus an, sie wird mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequence Detection System in "real time" bestimmt.

### 2.13.2. PCR Ansatz

Die PCR wird in einer 96-well Reaktionsplatte nach Zusatz von 10-20 µl zellulärer DNA (1-2 µg) pro Test in einem Volumen von 50 µl pro Ansatz durchgeführt (**Tab. 2.6**). Die Reaktionsgefäße (MicroAmp<sup>™</sup> „optical tubes“ oder „optical plates“) werden mit „optical caps“ verschlossen.

**Tab. 2.6. PCR Ansatz**

PCR-Mastermix	PCR Ansatz [ $\mu$ l]	Endkonzentration
Puffer A (10x)	5	1x
MgCl <sub>2</sub>	8	4 mM
Sense-Primer	1	400 nM
Antisense-Primer	1	400 nM
dATP, dCTP, dGTP	4	200 $\mu$ M
dUTP	5	400 $\mu$ M
Fluoreszenz-markierte Sonde	5	200 nM
Uracil-N-Glycosilase (UNG) (2,5 U/ $\mu$ l)	0,5	1,25 U
AmpliTaq Gold <sup>TM</sup> (2 U/ $\mu$ l)	0,25	0,5 U
Aqua dest. je nach Volumen der zugesetzten DNA	10,25 (0,25)	
Zelluläre DNA	10 (20)	max. 1-2 $\mu$ g
Reaktionsvolumen	50	

**Puffer A:** 50 mM KCl  
10 mM Tris-HCl, pH 8,3  
60 nM ROX (6-carboxy-x-rhodamine = passiver Referenzfarbstoff)

### 2.13.3 Temperatur-Zeit-Protokoll

Die PCR-Amplifikation und gleichzeitige Analyse in real-time erfolgte mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. Nach einer initialen 2- minütigen Inkubation bei 50°C, die der zugesetzten Uracil-N-Glycosilase (UNG) die Spaltung von möglicherweise kontaminierenden, Uracil- enthaltenden früheren Amplifikaten ermöglicht, erfolgt die Aktivierung der hitzeaktivierbaren AmpliTaq Gold<sup>TM</sup> DNA-Polymerase für 10 Minuten bei 95°C.

**Die dann folgende Amplifikation läuft über 50 Zyklen. Jeder Zyklus besteht aus:**

- |    |   |        |     |      |
|----|---|--------|-----|------|
| a) | Denaturierung der ds-DNA  | 15 sek | bei | 95°C |
| b) | Primer- und Sonden Anlagerung,<br>Extension und Sondenspaltung: | 1 min  | bei | 60°C |

Die Amplifikationsprodukte werden nach 50 Zyklen auf 4°C gekühlt und dann entweder über Nacht bei 4°C gelagert oder sofort bei -20°C tiefgefroren.

#### **2.13.4. Quantifizierung von PCR Ergebnissen**

Die Möglichkeiten der Quantifizierung der in einer Probe vorhandenen Kopienzahl einer gesuchten DNA Sequenz waren bis zur Entwicklung der TaqMan<sup>TM</sup> PCR methodisch sehr eingeschränkt, aufwendig und je nach Methode mit einer hohen Kontaminationsgefahr belastet. So brachten stochastische Experimente über die Testung von Verdünnungsreihen bis unter die Nachweisgrenze nur semi-quantitative Ergebnisse. Mit der kompetitiven PCR konnten zwar recht gute quantitative Ergebnisse gewonnen werden, diese Technik war jedoch mit einem hohen Zeitaufwand und einem inakzeptabel hohen Kontaminationsrisiko verbunden. Durch die Echtzeit-Datenaufnahme mit Hilfe des ABI Prism 7700 Sequence Detection Systems und der damit verbundenen automatischen quantitativen Bestimmung der Produkte in der exponentiellen Phase der Amplifikation ist es nun erstmals möglich, im Vergleich mit externen Standards eine sehr genaue, sehr gut reproduzierbare Quantifizierung zu erzielen (82, 83).

Als wichtigster Messpunkt dient in diesem System der Zeitpunkt (Zyklus), an dem zum erstmals eine signifikante Erhöhung der Reporteraktivität gegenüber einem zwischen dem 3. und 15. Zyklus ermittelten Fluoreszenz-Background nachweisbar ist. Dieser Zyklus wird als Schwellenzyklus, englisch: „threshold cycle“ ( $C_T$ ) bezeichnet. Da die Zahl der freien Reportermoleküle der Zahl der synthetisierten Kopien entspricht und diese wiederum während der logarithmischen Amplifikationsphase proportional zur anfänglich in der Probe vorhandenen Originalkopienzahl ( $X$ ) ansteigen, besteht zwischen dem „threshold cycle“ (Amplifikations-zyklus) und der initialen Kopienzahl ( $X$ ) des Zielgens eine enge Korrelation. Eine Halbierung der initialen Kopienzahl bedeutet eine Erhöhung des  $C_T$ -Wertes um etwa einen Zyklus. Dieser Zusammenhang kann für jede Verdünnungsreihe mathematisch erfaßt und als Standardkurve (siehe **Abb. 3.1**) dargestellt werden, mit deren Hilfe die initiale Kopienzahl einer unbekannt Probe bestimmt werden kann (84).

Die PCR ist eine exponentiell verlaufende Reaktion, bei der unter der Annahme einer Effizienz von 100% bei jedem Zyklus eine Verdopplung der Reaktionsprodukte des vorangegangenen Zyklus erfolgt. Dies kann mathematisch wie folgt beschrieben werden:

$$Y = X (1+E)^n$$

Y ist die Menge des hergestellten Amplifikats, X die Kopienzahl bei dem Start der Reaktion, E die Effizienz der Reaktion und n die Anzahl der PCR Zyklen. Für die Erstellung einer Standardkurve wird diese Gleichung in die logarithmische Form umgeschrieben:

$$\log Y = \log X + n \log (1+E)$$

Bei der graphischen Darstellung (siehe **Abb. 3.1**) wird  $\log X$  (Startkopienzahl) gegen den  $C_T$  Wert aufgetragen. Die Steigung dieser geraden leitet sich daraus wie folgt ab:

$$s = 1 / (\log 1 + E)$$

Diese Gleichung kann dann zur Berechnung der Effizienz (E) der Reaktion herangezogen werden:

$$\log (1+E) = 1/s$$

$$1 + E = 10^{1/s}$$

$$E = 10^{1/s} - 1$$

Die Effizienz der PCR liegt umso höher, je kürzer das zu produzierende Amplifikat ist (75 - 150 bp ist optimal, bis zu 400 bp ist die Effizienz meist noch zufriedenstellend).

## **2.14 Quantitative PCR Methoden zum Nachweis von SV40-DNA (T- Antigen Gen) und EBV-DNA (BKRF1 - kodierend für EBNA-1) sowie von t(14;18)-MBR-Translokationen, t(11;14) Translokationen und klonalen IgH-VDJ - Genrearrangements in B-Zell-Lymphomen**

### **2.14.1 Etablierung einer quantitativen real-time PCR zum Nachweis von SV40**

Für die N-terminale Region des Gens, das für SV40 T-Antigen kodiert, wurde eine quantitative real-time PCR etabliert. Ein DNA Fragment von 111 bp (4439 - 4549) basierend auf der SV40 DNA Sequenz des kompletten Genoms von SV40 (GenBank Nr. NC\_001669.1) wurde als Zielsequenz ausgewählt (siehe auch **Tab. 2.5**). Aufgrund der Homologie von SV40 mit BK und JC Virus wurde eine Fluoreszenz-Sonde gewählt, die eine Region von SV40 umfaßt, der 9 Basenpaare fehlen, die in der viralen DNA von BK und JC Virus vorhanden sind. Dadurch wird gewährleistet, dass virale DNA von BK und JC Virus im SV40-spezifischen Test nicht zu positiven PCR Ergebnissen führen kann.

Von jeder menschlichen DNA Probe wurden fünf Ansätze mit jeweils 1 µg zellulärer DNA auf SV40-DNA getestet, zur Bestimmung der Menge eingesetzten genomischen menschlichen DNA wurden drei Ansätze mit jeweils 0,1 µg DNA auf K-ras getestet. Nach der Amplifikation wurden alle Amplifikationsansätze der SV40-spezifischen PCR zusätzlich elektrophoretisch untersucht, um so auch Amplifikationsfragmente, die nicht mit der Sonde reagieren, d.h. kein positives Signal in der TaqMan-PCR Analyse ergeben, über eine Sequenzanalyse zu identifizieren.

### **2.14.2 Quantitative real-time PCR für EBV -DNA (BKRF1 kodierend für EBNA-1)**

Ein 74 bp Fragment des BKRF1 Gens, das für das EBNA-1 Protein (EBV Genom, Virusstamm B95-8; GenBank Nr. V01555.1) kodiert, wurde parallel zu den Genen von SV40 T-Antigen und K-ras amplifiziert. Die real-time PCR für BKRF1 wurde aufgrund unserer Erfahrungen mit einer Standard PCR für ein 430 bp Fragment des EBNA-1 Gens, die die 74 bp Zielsequenz enthält, ausgewählt (85). PCR-Ansatz und -Konditionen waren dieselben wie für SV40. Die verwendeten Primer und die Sonde sind in der **Tab. 2.5** aufgeführt.

### **2.14.3 Quantitative real-time PCR zum Nachweis von t(14;18)-MBR-Translokationen**

Der Nachweis der t(14,18)-MBR Translokation, die als spezifisch für folliculäre Lymphome angesehen werden kann, wurde mit einer ebenfalls in unserem Labor etablierten quantitativen real-time PCR geführt (84). Die verwendeten Primer und die Sonde sind in der **Tab. 2.5** aufgeführt.

### **2.14.4 Quantitative real-time PCR zum Nachweis von t(11;14)-Translokationen**

Der Nachweis der t(11;14)-Translokation, die als spezifisch für Mantelzell-Lymphome angesehen wird, wurde ebenfalls mit einer quantitativen real-time PCR geführt (86). Die verwendeten Primer und die Sonde sind in der **Tab. 2.5** aufgeführt.

### **2.14.5 Quantitative real-time PCR für das humane K-ras Gen**

Das menschliche K-ras Gen wurde einerseits als Test- Gen für die Intaktheit und Amplifizierbarkeit der isolierten zellulären DNA verwendet, andererseits als Referenz- Gen, um die Menge zellulärer DNA pro Einzeltest ausgedrückt in Genkopien zellulärer DNA (2 Gen-kopien K-ras/Zelle) zu bestimmen. Die verwendeten Primer und die Sonde sind in der **Tab. 2.5** aufgeführt.

### **2.14.6 Quantitative real-time PCR für Klon-spezifische IgH-VDJ-Genrearrangements in B-Zell-Lymphomen**

Die von Donovan et al. (87) beschriebene Methode wurde mit nur geringfügigen Modifikationen angewandt, um quantitative klon-spezifische PCR Analysen mit allel-spezifischen Primern für den Nachweis von minimalen residualen zirkulierenden Lymphomzellen bei Patienten mit malignen B-Zell-Lymphomen zu etablieren (88). Um initial ein klonales VDJ-Rearrangement identifizieren zu können, muß die Ausgangsprobe mindestens 0,1 - 1% klonale Zellen enthalten. In einem ersten Experiment wird die isolierte DNA in sechs verschiedenen PCR Ansätzen mit sechs V<sub>H</sub>-Familien-spezifischen Primern, sechs V<sub>H</sub>-Familien-spezifische Sonden und einem J<sub>H</sub>-consensus Primer analysiert (**Tab. 2.5**). Amplifikationsansätze mit positivem Ergebnis - identifiziert durch real-time PCR - werden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Ein als spezifisch anzusehendes DNA Fragment von ca. 180 bp wird aus dem Gel ausgeschnitten, reamplifiziert und sequenziert. Basierend



auf der Sequenzanalyse wird nach einem Homologievergleich mit bekannten V-, D- und J-Gensegmenten des IgH-Locus (89-91) ein Patienten- und Klon-spezifischer Primer ausgewählt, der schließlich zusammen mit dem J<sub>H</sub>-Konsensus-Primer und der Familien-spezifischen DNA-Sonde zur spezifischen Amplifikation der DNA klonaler B-Zellen eingesetzt werden soll. Die Spezifität dieser PCR wird mit DNA isoliert aus peripheren Blutproben des Patienten, die Lymphomzellen enthalten, mit DNA isoliert von mononukleären Zellen von 5 gesunden Kontrollpersonen und von 5 CLL Patienten validiert. Falls eine positive Reaktion mit DNA, die aus mononukleären Zellen von gesunden Kontrollpersonen oder CLL Patienten gewonnen wurde, auftritt, wird ein neuer "Patienten- und Klon-spezifischer-Primer" ausgewählt. Der endgültige Klon-spezifische PCR-Test ist sehr sensitiv und erlaubt den Nachweis einer einzelnen positiven Zelle in 10<sup>5</sup> normalen Zellen in einem einzelnen PCR Ansatz. Die mononukleären Zellfraktionen (PBMNC) verschiedener Lymphompatienten (**Tab. 2.3.**) waren in unserem Labor im Rahmen anderer Studien bereits getestet worden, sie enthielten zwischen 0,1% und >90% zirkulierende Lymphomzellen.

#### **2.14.7 Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen**

Um diese PCR Analysen erfolgreich durchführen zu können, muß vor allem die Gefahr der Kontamination durch „carry over“ (92), d.h. durch in vorherigen PCR-Ansätzen amplifizierte DNA, ausgeschlossen werden. Schon das in die Pipette hochgesaugte Aerosol mit einigen wenigen Molekülen DNA reicht aus, um - bei Verwendung der gleichen Pipette für PCR-Ansätze und der Analyse der PCR-Produkte - ein falsch positives Ergebnis zu erzeugen.

#### **Folgende Vorkehrungen wurden getroffen, um Kontaminationen zu vermeiden:**

- Alle Arbeiten erfolgten auf saugfähigen mit Plastik beschichteten Unterlagen, die täglich gewechselt wurden.
- Vor Beginn des Pipettierens wurde der Arbeitsplatz mit 0,1 M Natronlauge gereinigt.
- Die Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen wurden - wenn nicht schon beim Hersteller erfolgt - autoklaviert. Es wurden ausschließlich Reaktionsgefäße mit leicht zu öffnendem Deckel (vorzugsweise Schraubverschluß) verwendet, um Spritzer zu vermeiden.
- Arbeitshandschuhe wurden häufig gewechselt.
- Ansätze ohne DNA (Mastermix bestehend aus H<sub>2</sub>O, Puffer, Nukleotiden, Primer, Sonden, DNA-Polymerase und UNG) wurden in einem Raum pipettiert, in dem nicht mit DNA gearbeitet wird.
- Für die DNA-freien Ansätze wurde ein eigener Pipettensatz verwendet, der nur für diese

Ansätze und nur in dem eigens hierfür bestimmten Raum benutzt wurde.

- H<sub>2</sub>O wurde in einem Raum in kleinen Portionen abgefüllt, in dem nie mit DNA gearbeitet wird. Einmal geöffnete Portionen verworfen.
- Bei jeder PCR wurden mindestens zwei Negativkontrollen mitgeführt. Karpas-DNA oder Plasmid-DNA als Positivkontrollen wurden erst aufgetaut und pipettiert, nachdem alle anderen Reaktionsansätze bereits verschlossen waren.
- UNG spaltet DNA, in die Uracil statt Thymin eingebaut wurde. Für die DNA-Synthese wurde der Taq-Gold<sup>TM</sup> DNA-Polymerase dUTP statt dTTP zur Verfügung gestellt. Im Gegensatz zur eingesetzten genomischen DNA enthalten dann alle mittels PCR-Amplifikation erzeugten DNA-Kopien Uracil statt Thymin und können von der Uracil-N-Glycosylase vor der PCR-Amplifikation abgebaut werden (93).

## **2.15 Agarosegelelektrophorese**

Nukleinsäuren liegen im alkalischen und schwach sauren pH-Bereich als Polyanionen vor. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes können sie daher nach ihrem Molekulargewicht getrennt werden. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit ist auf Grund des konstanten Ladung / Masse-Verhältnisses proportional zu ihrem Molekulargewicht. Der Proportionalitätsbereich kann durch die Wahl der Porengröße, bestimmt durch die Agarosekonzentration des Gels, beeinflusst werden. Nach Färbung des Gels mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid, der in die DNA-Doppelhelix interkaliert, werden die DNA-Banden durch Anregung mit UV-Licht sichtbar.

### **2.15.1 Herstellung eines Agarosegels**

Für die in unserem Fall zu erwartenden DNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 100 bis 500 bp wurde eine Agarosekonzentration von 2% gewählt. In einem Mikrowellenherd wurde die Agarose in 1x TBE-Puffer durch kurzes Aufkochen gelöst. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurden 35 ml der heißen Agaroselösung in eine waagerechte Gießvorrichtung gegeben, in die zusätzlich ein Kamm mit 12 Taschen (je 4 mm x 1 mm) eingebracht war. Nach dem Erkalten wurde das Gel aus der Gießvorrichtung genommen und der Kamm entfernt. Die Gele konnten in 1x TBE-Puffer bei 4°C gelagert werden.

### 2.15.2 Vorbereitung der Proben für die Elektrophorese

Jeweils 10 µl der PCR-Produkte und 10 µl H<sub>2</sub>O wurden mit 4 µl 6x F-Stop-Mix versetzt. Durch den Zusatz von Bromphenolblau wurde die Lauffront sichtbar gemacht.

#### **Proben Puffer (6x F-Stop Mix):**

- EDTA pH 8,0            0,05 M
- SDS                      1 % (w/v)
- Ficoll 400              14 % (w/v)
- Bromphenolblau      0,4 % (w/v)

### 2.15.3 Durchführung der Elektrophorese

Das Agarosegel wurde in eine horizontale Gelelektrophoresekammer (Hoefer) gelegt und mit 1x TBE-Puffer bedeckt. Nach dem Auftragen der DNA-Proben wurde ein elektrisches Feld mit 140 V angelegt. Nach ca. einer Stunde hatte die Bromphenolblaufront das letzte Drittel des Agarosegels erreicht. Das Gel wurde dann zum Anfärben für 30 Minuten in eine Ethidium-bromidlösung (2 mg Ethidiumbromid pro 1 l TBE) gelegt. Dann wurde das Gel im UV-Licht photographiert (Polaroid-Photoeinrichtung) oder mit „GelDoc 2000“ in einen Computer eingescannt und mit der Analysesoftware „Quantity One“ ausgewertet. Im Vergleich zu parallel elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmenten bekannter Größe (z.B. pUC18 geschnitten mit dem Restriktionsenzym HpaII, s.u.) konnte die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente im UV-Licht ermittelt werden.

### 2.15.4 Herstellung von Molekulargewichtsmarkern (pUC18 / HpaII)

Zur Bestimmung der Größe der elektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente verwendeten wir die DNA des Plasmids pUC18, die mit dem Restriktionsenzym HpaII in bekannte DNA-Fragmente genau definierter Länge geschnitten wird, als Referenz. Das Plasmid pUC18 wurde wie unter **2.16** beschrieben in *E. coli* kloniert, dann wurde die Plasmid DNA wie beschrieben isoliert. 10 µg Plasmid DNA wurde mit 36 Einheiten HpaII über Nacht bei 37°C verdaut. Die DNA wurde in kleinen Portionen aliquotiert und bei 4°C gelagert. Es entstehen DNA-Fragmente folgender Länge (in bp): 501/489 - 353 - 242 - 190 - 147 - 90 - 47.

## **2.16. Herstellung von Plasmid-DNA-Standards für die quantitative real-time PCR (SV40-T-Ag, BKRF-1, t(14;18), t(11;14), K-ras)**

Die quantitative real-time PCR bietet gegenüber früheren PCR-Methoden die Möglichkeit, direkt, exakt und reproduzierbar eine Quantifizierung des zu untersuchenden Gens vorzunehmen. Voraussetzung hierfür sind stabile Standards mit definierter Kopienzahl. Neben kompletter viraler SV40-DNA und zellulärer genomischer DNA der t(14;18)-positiven Zelllinie „Karpas 422“ wurden hierzu die in Bakterien klonierten DNA-Zielsequenzen der viralen Gene von SV40 und EBV, der amplifizierten Klon-spezifischen VDJ-Regionen (IgH-CDR3) maligner Lymphome und die klonierten Bruchpunktregionen von t(14;18) und t(11;14) Translokationen als Standards verwendet. Für die Etablierung der Standardkurven für K-ras wurden sowohl genomische DNA als auch die entsprechende klonierte Zielsequenz verwendet.

### **2.16.1 Transformation und Selektion rekombinierter Bakterienklone**

Der von uns verwendete Vektor, das Plasmid pCR<sup>TM</sup> 2.1 (Invitrogen, Leek, Niederlande) trägt ein Resistenzgen für Ampicillin, so daß bei Zugabe dieses Antibiotikums zum Agar alle Bakterien, die das Plasmid nicht aufgenommen haben, abgetötet werden. Der Bakterienstamm Oneshot<sup>TM</sup> (Invitrogen) trägt ein F-Episom, das unter anderem für das für sich allein enzymatisch inaktive T-Fragment der  $\beta$ -Galaktosidase kodiert. Werden Bakterien dieses Stammes mit dem Plasmid pCR<sup>TM</sup> 2.1 transformiert, das für die  $\alpha$ -Untereinheit der  $\beta$ -Galactosidase kodiert, so wird aus den beiden enzymatisch inaktiven Untereinheiten durch sogenannte  $\alpha$ -Komplementation ein enzymatisch aktives Protein gebildet. Mit intaktem Plasmid transformierte Klone können dann auf Agarplatten nach Induktion der  $\beta$ -Galactosidase mit IPTG und Zugabe des Farbstoffes X-gal durch ihre blaue Farbreaktion nachgewiesen werden.

Die Insertionsstelle für das zu klonierende Genfragment liegt in dem Plasmid pCR<sup>TM</sup> 2.1 innerhalb des für die  $\alpha$ -Untereinheit der  $\beta$ -Galactosidase kodierenden Genabschnittes. Die Insertion des zu klonierenden Gens an diese Stelle inaktiviert die  $\alpha$ -Untereinheit und verhindert die  $\alpha$ -Komplementation der  $\beta$ -Galactosidase zu einem inaktiven Enzym. Nach Induktion der  $\beta$ -Galactosidase mit IPTG und Zugabe des Farbstoffes X-gal bleibt die blaue Farbreaktion aus. Die entstandenen weißen, Ampicillin-resistenten Kolonien, die das gewünschte rekombinante Plasmid enthalten, können gezielt ausgesucht und weiter kloniert werden.

## **2.16.2 Durchführung der Klonierung**

### **2.16.2.1 Ligation**

Die mit der PCR-Amplifikation gewonnenen DNA-Fragmente der gewünschten Zielsequenzen (t(14;18) von Karpas 422, K-ras, SV40-T-Antigen, EBV-BKRF-1, IgH-VDJ u.a.) wurden mit linearisierter Vektor DNA (pCR<sup>TM</sup> 2.1) zusammengegeben, für 5 Minuten bei 45°C inkubiert, auf Eis abgekühlt und mit 1 :1 10x Ligase Puffer (660 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM DTE; 10 mM ATP) und 4 „Weiss“ Units T4 DNA Ligase versetzt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 14°C.

Die mit der PCR amplifizierten ds-DNA-Fragmente weisen aufgrund der Eigenschaft der Taq-Gold DNA-Polymerase, am Ende der Extension einen Adenosinrest anzuhängen, auf beiden Seiten am 3'-Ende einen sogenannten A-Überhang auf. Dem A-Überhang der amplifizierten DNA steht an beiden 5'-Enden des Vektors (pCR<sup>TM</sup> 2.1) ein T-Überhang gegenüber. Dies verhindert eine Selbstligation des Vektors ohne Einbau des gewünschten DNA-Fragments und erleichtert die Ligation durch die zugesetzte T4 DNA Ligase aufgrund der sich zwischen den A- und T- Basen ausbildenden Wasserstoffbrückenbindungen.

### **2.16.2.2 Transformation und Selektion der positiven Klone**

6 :1 des Ligationsansatzes wurden zu kompetenten Bakterienzellen (Oneshot<sup>TM</sup>, Invitro-gen) hinzugegeben und 60 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer Inkubation im Wasserbad bei 42°C für 90 Sekunden und für 2 Minuten auf Eis wurden 800 µl LB-Medium zugegeben. Dann wurden die Bakterien für eine Stunde bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. In der Zwischenzeit wurden Agarplatten vorbereitet. Hierzu wurde LB-Medium in der Mikrowelle aufgekocht, dann auf etwa 55°C abgekühlt und nach Zugabe von 1 µl Ampicillin (50µg/µl) je ml LB in Petrischalen - je 20 ml - ausgegossen. Auf jede Platte wurden 35 µl X-Gal (2%) und 20 µl IPTG (100 mM) verteilt. Dann wurden 200 µl des Transformationsansatzes pro Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit rekombinantem Vektor transformierte Bakterien bilden wie oben beschrieben weiße Kolonien. Anteile einzelner weißer Klone wurden vorsichtig mit einem sterilen Zahnstocher angepöckelt, in ein PCR-Röhrchen transferiert und mit der PCR auf das gewünschte DNA Fragment untersucht. Bei positivem PCR-Ergebnis wurden diese Klone zur weiteren Anzucht ausgewählt.

### **2.16.3 Züchtung der rekombinanten Klone**

Zur Anzüchtung positiver Klone wurden 35 ml LB-Medium mit 35 µl Ampicillin (50 µg/µl) in einem 50 ml Röhrchen angesetzt. Das Nährmedium wurde mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers mit Anteilen einer positiven Kolonie der primären Agarplatte beimpft. Die Röhrchen wurden für 16 h in einem Schüttler bei 37°C und einer Schüttelfrequenz von 180/min inkubiert.

### **2.16.4 Präparation und Linearisierung der Plasmid DNA**

Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des "Qiagen Plasmid Mini Kits" (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die präparierte Plasmid-DNA wurde durch enzymatischen Verdau mit Hind III linearisiert [86 µl Plasmid-DNA (~30 µg) + 10 µl B-Puffer (Boehringer, Mannheim, Deutschland) + 4 µl Hind III (10U/µl) für 1h bei 37°C]. Der Verdau wurde anschließend elektrophoretisch kontrolliert.

## **2.17 Sequenzanalysen**

### **2.17.1 Allgemeines**

Sanger et al. beschrieben 1977 eine Methode, die Basenabfolge eines DNA-Fragments über durch Inhibitoren verursachte Kettenabbrüche zu bestimmen (94). Als Inhibitoren der DNA-Synthese wurden Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTP's) und Arabinonukleotid-triphosphate (araNTP's) in Gegenwart der DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) eingesetzt. Die ddNTP's verursachen Kettenabbrüche, da sie an der 3'-Position der Ribose keine Hydroxylgruppe aufweisen, an die normalerweise das nächste Nukleotid angehängt wird. Das für diese Analyse notwendige Verhältnis von ddNTP's zu dNTP's liegt bei etwa 100:1.

Bei der moderneren Variante dieses Verfahrens ist jedes der vier verwendeten ddNTP's (ddATP, ddUTP, ddCTP, ddGTP) mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Während der Sequenzierreaktion entstehen alle nur denkbaren DNA-Fragmente, die jeweils mit einer Sequenz-spezifischen fluoreszenzmarkierten ddNTP-Base enden. Bei gleichzeitiger elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente und Identifizierung der letzten modifizierten Base (ddNTP) über ihre spezifische Fluoreszenz kann die gewünschte Sequenz automatisiert Base für Base ermittelt werden.

### 2.17.2 Sequenzierung der PCR-Produkte

Die Sequenzierung spezifischer und unspezifischer Amplifikationsprodukte der SV40-T-Ag-spezifischen PCR wurde nach einer Reihe von Probenaufarbeitungsschritten (s.u.) mit dem ABI PRISM Sequence Analyser 310 durchgeführt.

Die Elektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid der Amplifikationsprodukte wurde wie unter **2.15** beschrieben durchgeführt. Die für die Sequenzierung ausgewählten Banden wurden unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Agarosegel erfolgte dann mit Ultrafree® Millipore Säulen (Amicon® Bioseparations) nach der Vorschrift des Herstellers. Falls sich nach der Zentrifugation kein Eluat ergab, erfolgte eine 2. Elution mit 20 µl Aqua dest. und eine erneute Zentrifugation.

Die aus dem Agarosegel extrahierte DNA wurde nochmals mit der PCR amplifiziert, um eine größere Menge der DNA-Fragmente zu erhalten, die als Matrizen in der Sequenzierungsreaktion eingesetzt werden sollten. Die Reamplifikations-PCR wurde nach gleichem PCR-Schema mit denselben Primern ohne UNG und mit dTTP statt dUTP in einem Reaktionsvolumen von 100 µl über 40 Zyklen durchgeführt. Von der extrahierten DNA wurden 5 µl pro PCR-Ansatz eingesetzt.

Die Produkte der Reamplifikation wurden wiederum mit einer Agarosegelelektrophorese kontrolliert. Wenn im Gel eine eindeutige Bande zu sehen war, wurde das PCR-Produkt über eine YM-100 Säule (Millipore, Amicon® Bioseparations) weiter gereinigt, um überschüssige Nukleotide zu entfernen. Diese DNA wurde dann in die Sequenzierreaktion eingesetzt. Hierzu wurde der BigDye Terminator Sequenzierungskit (PE Applied Biosystems) verwendet. Die Sequenzierreaktion erfolgte im Thermozykler 2400 (PE Applied Biosystems).

### **Amplifikation zur Sequenzierung:**

- Denaturierung: 15 sec 95°C
  - Annealing und Extension: 90 sec 61°C
- 30 Zyklen

Nach der Reinigung der Sequenzierprodukte über „Centrisep“-Säulen (Princeton Separations), um überschüssige fluoreszenzmarkierte ddNTP's zu entfernen, und nach Trocknen des Eluats in der Vakuumzentrifuge (Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen) für 5-Minuten wurde das Sediment in 20 µl TSR (Template Suppression Agent) aufgenommen und mehrfach im ABI PRISM Sequence Analyser 310 analysiert. Die Auswertung der Sequenzanalysen erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms „DNASIS“ unter Verwendung der Genbanken „Genebank“ und „EMBL“ (Pharmacia Biotech Europe GmbH, D-79111 Freiburg).



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung einer quantitativen real-time PCR zum Nachweis von SV40- DNA, Generierung von Standardkurven

Die PCR Produkte aller untersuchten Gene wurden mit Hilfe des TA Cloning Kits in das Plasmid pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Paisley, UK) kloniert. Rekombinante Plasmide, die amplifizierte DNA Fragmente enthielten, wurden durch Digestion mit Hind III linearisiert und spektrophotometrisch quantifiziert. Basierend auf früheren Experimenten (84) wurden DNA- Lösungen der Standards von t(14;18), t(11;14) und K-ras mit 50 mM Tris/EDTA pH 7,5 unter Zugabe von Hering Sperma DNA (1:g/ml) bei -20°C eingefroren, um die Degradation der Standard-DNAs während der Einfrier- und Auftau- Prozesse zu minimieren. Die so aliquotierten und gelagerten Standards dienten als Positivkontrollen und Referenzstandards in quantitativen PCR Analysen.

Zum Nachweis von SV40 wurde eine quantitative real-time PCR für die N-terminale Region des Gens, das für das SV40 T-Antigen kodiert, etabliert. Um falsch-positive Werte durch die Erkennung einer mögliche Amplifikation von BK oder JC Virus durch die Fluoreszenzsonde zu vermeiden, war für die SV40-spezifische Fluoreszenzsonde eine Zielsequenz gewählt worden, der 9 in BK und JC Virus vorhandene Nukleotide fehlen.

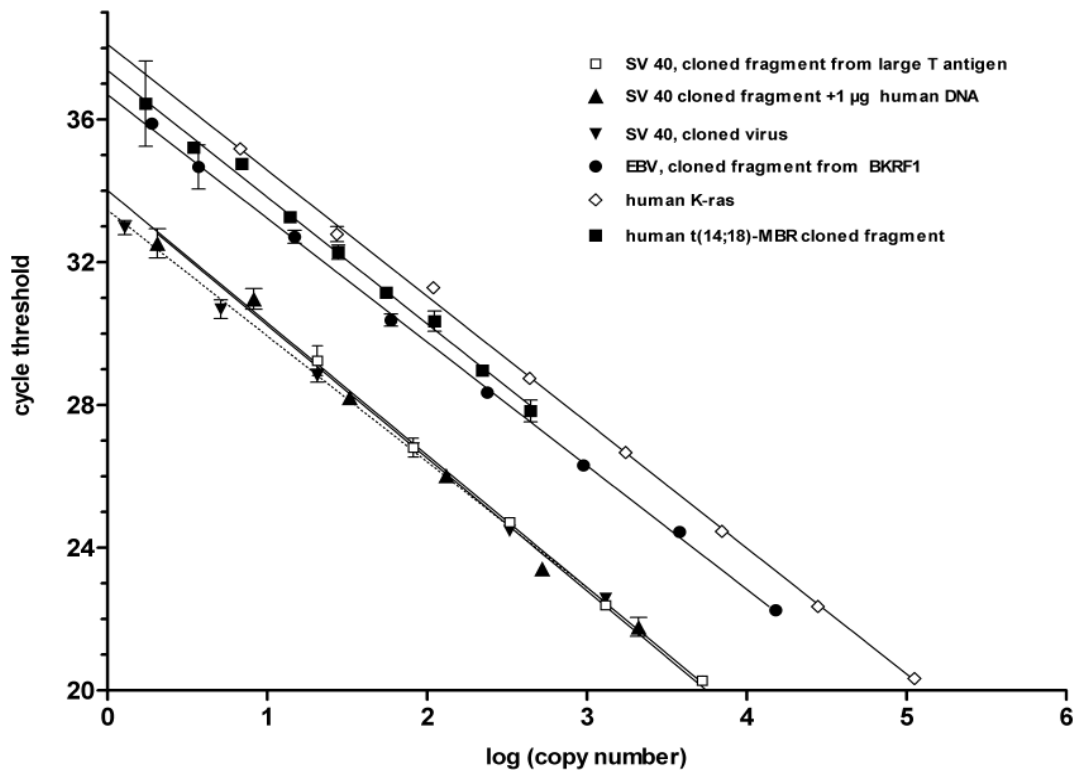
Im Falle von SV40 wurden linearisierte klonale virale DNA (Stamm pUCS40-CPC/MEN1 [ATCC Katalog No. VRMC-4] und das in das Plasmid pCR2.1-TOPO klonierte amplifizierte DNA Fragment des T-Antigens als Standards für die Quantifizierung benutzt. Für die ersten Experimente zur Etablierung der PCR Technik wurde die Anzahl der eingesetzten Genkopien der DNA Standards basierend auf OD Messungen festgelegt. Um die Standardkurven für die Quantifizierung zu generieren, wurden 2-fach-Verdünnungsschritte ( $10^5$  bis  $<1$  Kopie) der DNA Standards in jeweils 3 separaten Ansätzen amplifiziert. Die resultierenden  $C_T$ -Werte wurden gegen den Logarithmus der Kopienzahlen der betreffenden Gene aufgetragen (**Abb. 3.1**). Basierend auf der statistischen Evaluation der Standardkurven und ihrer Steigung betrug die Effizienz der Amplifikation für alle Zielgene etwa 85-95% (siehe Methoden).

Die Bestimmung der initial eingesetzten Genkopien basierend auf der OD Messung ist jedoch aufgrund der Kontamination der DNA Präparationen durch Nukleotide und kleine Oligonukleotide, die durch die Degradation von Nukleinsäuren entstehen, sehr ungenau. Aus diesem Grund wurden mehrere zweifach- Verdünnungsschritte, die eine oder weniger Kopien pro Test enthalten, mindestens 10x getestet. Die Anzahl der positiven und negativen Ergebnisse aus diesem "multiple tube approach" wurde dann genutzt, um die Kopienanzahl in der Probenlösung durch "maximum likelihood estimation" zu berechnen (95). Dieses Vorgehen führt im Vergleich zur Abschätzung der DNA-Konzentration (und

damit der Zahl der eingesetzten Kopien) über die OD Messung zu einer präziseren Angabe des Y-Schnittpunktes der Geraden ( $C_T$ -Wert für eine Kopie). Alle Standardkurven wurden mit Hilfe dieses Verfahrens korrigiert (**Abb. 3.1**). In der Vergangenheit haben wir verschiedenste Gene, wie t(14;18), t(11;14),  $\beta$ -actin, GAPDH und andere, mit individuell optimierter quantitativer real-time PCR basierend auf der TaqMan Technik getestet. In allen Fällen lagen die Schnittpunkte der Standardkurven mit der Y-Achse bei  $C_T$ -Werten zwischen 37 und 39. Sowohl die Standardkurve des klonierten Amplifikationsfragmentes des SV40 T-Antigenes von 111 bp als auch die Standardkurve der kompletten viralen SV40 DNA kloniert in ein Plasmid wurden mit Hilfe dieser stochastischen Methode korrigiert. Die Schnittpunkte der Standardkurven für SV40-Gene mit der Y-Achse lagen bei  $C_T$ -Werten zwischen 33 und 34. Bis jetzt haben wir noch keine Erklärung für diese von allen bisher getesteten Genen unterschiedlichen Standardkurven gefunden.

Nachdem eine erste Standardkurve mit einer klonierten SV40- Zielsequenz etabliert war, wurden Verdünnungen als Standards vorbereitet, die 10, 100 und 1000 Kopien des Zielgens enthielten. Diese wurden in kleinen Mengen bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt und als positive quantitative Referenzstandards in jedem PCR-Experiment eingesetzt.

Aufgrund einer Vielzahl von Experimenten mit anderen Zielgenen als dem SV40-T-Antigen Gen und der auch hier gezeigten Standardkurven sind wir der Meinung, daß wir unter optimalen PCR-Bedingungen in stochastischen Experimenten mit unserer real-time PCR **eine Kopie** eines Zielgens erkennen können. Mit mikroskopisch isolierten t(14;18)-positiven Einzel-zellen konnten wir diesen Beweis führen. Dies für jedes Gen durchzuführen, ist jedoch zu arbeitsaufwendig und bezüglich der Fragestellung nicht weiterführend.



**Abb. 3.1** Standardkurven der quantitativen real-time PCR (TaqMan<sup>R</sup>) für das SV40 “large” T-Antigen Gen, EBV-BKRF-1 (EBNA-1), das menschliche K-ras Gen und die t(14;18) MBR-Translokation amplifiziert mit DNA isoliert von der Zell-Linie Karpas 422

Linearisierte Plasmid-DNA, die die klonierten Ziel-DNA-Fragmente oder im Fall von SV40 das komplette SV40 Genom enthielt, wurde in 2-fach Verdünnungsschritten ( $10^5$  bis  $<1$  Kopie) verdünnt und in jeweils 3 separaten Ansätzen amplifiziert. Die resultierenden  $C_T$ -Werte wurden gegen den Logarithmus der eingesetzten Genkopien aufgetragen. Die Standardkurven wurden wie in (84, 95) beschrieben - aufgrund von stochastischen Analysen zur Bestimmung des  $C_T$ -Wertes für eine Kopie des Zielgens korrigiert. Im Falle des klonierten 111 bp Fragmentes des SV40 “large” T-Antigens wurde in einem separaten experimentellen Ansatz allen DNA-Verdünnungsschritten zusätzlich 1  $\mu\text{g}$  menschliche DNA isoliert von PBMNC eines gesunden Freiwilligen zugesetzt, um eine Konzentration menschlicher genomischer DNA von 1  $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$  Testvolumen zu erreichen, wie sie später bei der Analyse von menschlichen Gewebeproben eingesetzt wird.

Die **Abb. 3.1** zeigt weiterhin, daß die Standardkurven des klonierten SV40 T-Antigen-fragmentes (111bp) mit und ohne Zusatz von 1  $\mu\text{g}$  humaner DNA (pro Einzeltest) präpariert aus PBMNC identisch sind. D.h., daß die Nachweisbarkeit von SV40 T-Antigen-

DNA durch hohe Konzentrationen humaner DNA nicht negativ beeinflusst wird, und daß die Standardkurve auch nicht verändert wird. Leider standen uns für eine weitere Validierung der SV40-spezifischen PCR keine Gewebeproben von SV40-positiven und negativen tierischen Tumoren zur Verfügung.

### **3.2 Wiedergewinnung kleiner ds-DNA Moleküle (analog sog. "episomaler" Virus-DNA) bei der Präparation menschlicher genomischer DNA**

Aufgrund der Möglichkeit, daß SV40 in NHL Zellen entweder in das Wirtgenom integriert ist oder in episomaler Form vorliegen könnte, wurde die DNA Präparation für die Rückgewinnung kleiner ds-DNA Moleküle von etwa 4 kb in der Anwesenheit überschüssiger menschlicher genomischer DNA evaluiert. Etwa 500, 5.000, 50.000 und 100.000 Kopien rekombinanter SV40-Plasmid DNA (etwa 4 kb) wurden vor der DNA Isolierung zu 4 Zellproben von  $5 \times 10^6$  PBMNC eines gesunden Freiwilligen (PCR negativ für SV40 DNA) hinzugegeben. Bei der dann erfolgten DNA-Präparation konnten - bestimmt mit quantitativer real-time PCR - 50-90% der rekombinanten Plasmid DNA zurückgewonnen werden (**Tab. 3.1.**). In den Experimenten mit der niedrigsten SV40 Kopienzahl (etwa 500 Kopien in  $5 \times 10^6$  menschlichen Zellen) konnten sehr geringe Kopienzahlen von bis zu 4 Kopien klonierter SV40 DNA in  $10 \mu\text{l}$  50 mM Tris/EDTA pH 8,0, die zusätzlich  $0,5 \mu\text{g}$  menschliche genomische DNA enthielten, nachgewiesen werden.

Diese experimentellen Ergebnisse zeigen, daß die Wahrscheinlichkeit, bei der Präparation menschlicher DNA aus PBMNC eventuell vorhandene episodale SV40 DNA isolieren zu können, sehr hoch ist. Sollte SV40 DNA in episomaler Form in einer 1:1 Relation in den Tumorzellen maligner Lymphome vorliegen, so müßte es möglich sein, virale DNA zusammen mit humaner genomischer DNA aus menschlichem Gewebe auch dann in ausreichender Quantität für den Nachweis mit der PCR zu isolieren, wenn nur sehr wenige Lymphomzellen im peripheren Blut oder im Lymphknoten oder der Milz vorhanden sind.

**Tab. 3.1 Wiedergewinnung niedermolekularer ("episomaler") Plasmid- DNA,** die ein 111 bp DNA-Fragment des SV40 T-Ag-Gens enthielt, bei der Präparation humaner genomischer DNA aus tiefgefrorenen PBMNC eines SV40-DNA (PCR) - negativen Spenders

<b>Experiment</b>	<b>Zahl der für die DNA-Präparation eingesetzten PBMNC</b>	<b>zugesetzte SV40 - DNA Kopien (Plasmid-DNA) bestimmt mit der quantitativen PCR</b>	<b>nach der DNA-Präparation mit der PCR wieder gefundene SV40-DNA-Kopien</b>	<b>Ausbeute (%)</b>
<b>A</b>	<b>6,5 x 10<sup>6</sup></b>	<b>108000</b>	<b>98768</b>	<b>92</b>
<b>B</b>	<b>6,8 x 10<sup>6</sup></b>	<b>69372</b>	<b>34380</b>	<b>50</b>
<b>C</b>	<b>4,7 x 10<sup>6</sup></b>	<b>4356</b>	<b>2288</b>	<b>53</b>
<b>D</b>	<b>4,6 x 10<sup>6</sup></b>	<b>544</b>	<b>281</b>	<b>52</b>

### **3.3 SV40 - spezifische PCR-Analysen an menschlichen Gewebeproben von malignen Lymphomen und Kontrollen**

In einer ersten Versuchsreihe sollte SV40 DNA, d.h. eine 111 bp lange Sequenz des SV40 T-Antigens, in direkt nach Entnahme tiefgefrorenem Biopsiematerial von malignen Lymphomen nachgewiesen werden. Hierzu wurden Proben von 30 Lymphknoten und 3 Milzen von 27 Patienten mit NHL (**Tab. 2.2.**) verwendet (8 diffus großzellige Lymphome, 1 Burkitt Lymphom, 5 follikuläre Lymphome, 13 andere maligne Lymphome niedrigen Malignitätsgrades) und 6 Proben von Patienten mit Morbus Hodgkin. 14 Kontrollen bestanden aus Lymphknoten mit unspezifischer Entzündung von 4 HIV infizierten Personen, 6 Lymphknotenmetastasen solider Tumoren und 4 Lymphknoten mit histologisch nachgewiesener benigner follikulärer Hyperplasie. Die Ergebnisse dieser Tests sind in **Tab. 3.2** zusammengefaßt. Mit der quantitativen real-time PCR wurden pro Gewebeprobe bzw. DNA-Präparation jeweils 5 Einzeltests mit mindestens 1 µg zellulärer DNA (~ 140.000 Zellen) durchgeführt. In keinem der Fälle konnte SV40 T-Antigen DNA nachgewiesen werden. Im Hinblick auf diese Ergebnisse ist nochmals zu betonen, daß die Zugabe von 1 µg menschlicher genomischer DNA - isoliert von SV40 negativen PBMNC - zu einer Verdünnungsreihe von SV40 DNA Standards nicht mit dem Nachweis der SV40 DNA interferierte

**(Abb. 3.1).** Um zu demonstrieren, daß die DNA isoliert von Lymphknoten und Milz quantifizierbare DNA enthält, wurden alle DNA Präparationen mittels quantitativer real-time PCR für eine Sequenz des BKRF-1 Gens des EBV und simultan für das K-ras Gen getestet, um die Zellzahl zu bestimmen. 19 von 33 Proben ergaben in der EBV- spezifischen PCR positive Ergebnisse, wir fanden zwischen 5 und 80.000 Kopien des EBNA-1 Gens pro 100.000 Zellen. Die höchste EBV-Kopienzahl von >80.000 pro 100.000 Zellen konnte in dem Lymphknoten eines Patienten mit dem Relaps eines Hodgkin Lymphoms nachgewiesen werden.

**Tab. 3.2 Ergebnisse der quantitativen real - time PCR für den Nachweis des SV40 T-Antigen Gens und des EBV-EBNA-1 Gens (BKRF1) bei Patienten mit malignen Lymphomen und Kontrollen**

Angeführt sind Lymphknoten- (LK) und Milzproben von Patienten mit malignen Lymphomen und Kontrollen (grau unterlegt) unter Angabe von Patienteninitialen, dem Datum der Entnahme und des Alters des Patienten bei der Gewebsentnahme, der histopathologischen Diagnose, der Ergebnisse der quantitativen real- time PCR für das EBV- EBNA-1 Gen (BKRF1) und für das SV40 T-Antigen Gen. Die einzelnen Ergebnisse der K-ras PCR sind nicht angegeben, da nur die Ergebnisse von Experimenten aufgeführt sind, bei denen pro DNA-Präparation aus einem Gewebe in jedem von 5 Einzeltesten eine 1 µg DNA - entsprechend 140.000 Zellen oder ca. 280.000 K-ras Kopien - untersucht wurde.

Abkürzungen: DLCL - diffuse large cell lymphoma; BL - Burkitt Lymphom; FL - follikuläres Lymphom; n.m. NHL - niedrig-malignes Non-Hodgkin-Lymphom; PLL - Prolymphozytenleukämie; HCL -Haarzell-Leukämie; CLL - chronische lymphatische Leukämie; HL - Hodgkin Lymphom; SCLC - small cell lung cancer; NSCLC - Non small cell lung cancer; BFH - benigne follikuläre Hyperplasie.

Patient	Datum	Alter (Jahre)	Diagnose	Gewebe	EBNA-1 Kopien/ 10 <sup>5</sup> Zellen	SV40 DNA (T-AG)
H.J.	251088	40	DLCL	LK	neg.	neg
W.A.	91288	61	DLCL	LK	247	neg
F.R.	90389	44	BL	LK	neg.	neg
H.E.	170389	49	DLCL	LK	591	neg
S.H.	40391	41	DLCL (T-Zell )	LK	neg.	neg
J.P.	02.03.92	36	DLCL (HIV+)	LK	543	neg
H.J.	310894	21	DLCL	LK	neg.	neg
B.E.	07.03.91	63	DLCL	LK	neg.	neg
S.G.	03.03.98	61	DLCL	LK	neg.	neg
S.K.	13.12.89	79	FL	LK	neg.	neg
H.A.	21.12.89	60	FL	LK	30	neg
K.M.	12.09.91	43	FL	LK	neg.	neg
S.E.	11.05.92	24	FL	LK	neg.	neg
H.U.	08.06.94	50	FL	LK	45	neg
W.M.	03.03.88	58	n.m. NHL	LK	5	neg
M.F.	13.10.88	67	n.m. NHL	LK	315	neg
W.J.	31.10.88	55	n.m. T-NHL	LK	290	neg
S.I.	02.01.89	50	PLL	LK	neg.	neg
S.V.	02.03.89	43	n.m. NHL	Milz	neg.	neg
S.B.	15.02.90	80	n.m. NHL	LK	13	neg
S.T.	16.01.92	51	n.m. NHL	Milz	17	neg
V.J.	09.12.93	27	n.m. NHL	LK	13	neg
S.U.	06.12.93	80	n.m. NHL	LK	neg.	neg
K.I.	09.11.94	65	n.m. NHL	LK	1984	neg
W.L.	10.11.94	71	n.m. NHL	LK	81	neg
S.H.	30.10.90	66	HCL	Milz	36	neg
R.M.	27.02.91	53	CLL	LK	5	neg
F.A.	13.07.89	31	HL	LK	18	neg
M.M.	28.02.90	22	HL	LK	26	neg
D.L.	15.01.89	30	HL	LK	neg.	neg
W.M.	29.12.90	18	HL	LK	neg.	neg
B.H.	26.03.91	52	HL, Relapse	LK	82815	neg
R.U.	09.05.91	25	HL	LK	508	neg
S.L.	25.01.89	34	HIV	LK	464	neg
B.V.	25.04.89	45	HIV	LK	1959	neg
A.A.	16.01.90	31	HIV	LK	247	neg
H.H.	06.03.92	51	HIV	LK	63	neg
G.G.	16.02.88	43	Seminom	LK	10	neg
S.F.	03.01.89	54	Adenocarcinom	LK	neg.	neg

Patient	Datum	Alter (Jahre)	Diagnose	Gewebe	EBNA-1 Kopien/ 10 <sup>5</sup> Zellen	SV40 DNA (T-AG)
R.W.	22.12.88	67	SCLC	LK	109	neg
K.F.	01.12.88	69	NSCLC	LK	neg.	neg
E.G.	30.01.89	59	Hypopharynxca.	LK	n.d.	neg
M.T.	26.09.89	62	Ösophagusca.	LK	23	neg
Z.L.	23.01.89	63	BFH	LK	5	neg
D.H.	21.01.92	29	BFH	LK	neg.	neg
W.H.	12.03.92	51	BFH	LK	416	neg
B.F.	19.01.93	21	BFH	LK	14	neg

### 3.4 Elektrophoretische Analyse der Amplifikationsprodukte der SV40-spezifischen PCR mit DNA isoliert aus menschlichen Gewebeproben

Aufgrund dieser negativen Ergebnisse analysierten wir alle amplifizierte Produkte der aus den Lymphknotenproben gewonnenen DNA-Präparationen mit der Agarosegelelektrophorese, um eventuell amplifizierte DNA Fragmente, die keine zu der gewählten SV40-spezifischen Sonde homologen Sequenzen hatten, zu erkennen. Bei 6 Patienten fanden wir DNA Fragmente, die mit der SV40 T-Antigen spezifischen PCR amplifiziert worden waren. In 5 Fällen handelte es sich um DNA Fragmente zwischen 100 und 120 bp, in einem Fall um ein DNA Fragment von etwa 400 bp. Alle DNA Fragmente wurden kloniert und sequenziert. Mit der BLAST Search Routine <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> wurden diese Sequenzen mit allen in der Genbank vorhandenen Sequenzen verglichen. Keine der amplifizierten DNA Sequenzen zeigte eine Homologie zu der DNA-Sequenz des SV40 T-Antigens, der kompletten viralen SV40-DNA oder einer anderen Sequenz in der Genbank.

### 3.5 Quantifizierung von Lymphomzellen in peripheren Blutproben von Lymphompatienten

Zusätzlich wurden periphere mononukleäre Blutzellen (PBMNC) und Knochenmarkproben (KM) von 48 Patienten mit malignen NHL, die nicht mit den in der **Tab. 3.2.** aufgelisteten Patienten identisch waren, untersucht. Diese Proben (**Tab. 2.3**) waren zwischen 1992 und 2002 im Verlaufe von klinischen Studien zur Analyse der minimalen Resterkrankung gewonnen worden. 28 PBMNC und 7 KM Proben stammten von Patienten mit follikulärem Lymphom, weitere PBMNC von 9 Patienten mit Mantelzell-Lymphom, 3 Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie



(CLL) und einem Patient mit einer Haarzell-Leukämie (HCL). PBMNC von 47 gesunden Blutspendern (**Tab. 2.4**) dienten als Kontrollen. Die Quantifizierung der malignen Lymphomzellen war ebenfalls mit der real-time PCR Technik erfolgt: bei follikulären Lymphomen (FL) über die Erkennung der t(14;18) Translokation, bei Mantelzell-Lymphomen (MCL) über die t(11;14) Translokation. Bei B-Zell Lymphomen, die keine spezifische Translokation aufwiesen, erfolgte die Quantifizierung der Lymphomzellen (z.B. bei der chronischen lymphatischen Leukämie und der Haarzell-Leukämie) über das klonale VDJ-Rearrangement des IgH-Locus.

Ein Ziel der Arbeit war es, die quantitative real-time PCR Technik zu nutzen, um SV40 Sequenzen in menschlichen Lymphomzellen zu finden und nach einer direkten klonalen Beziehung zu malignen Lymphomzellen zu suchen. Im Verlauf klinischen Studien waren in unserer Arbeitsgruppe zirkulierende Lymphomzellen in der mononukleären Zellfraktion des peripheren Blutes und in Knochenmarkproben von Patienten mit follikulärem Lymphom, Mantelzell-Lymphom, CLL und Haarzell-Leukämie quantitativ nachgewiesen worden (**Tab.3.3**). PBMNC Proben von 9 Patienten mit Mantelzell-Lymphom (MCL) enthielten zwischen 1.000 und 100.000 zirkulierende Lymphomzellen pro 100.000 mononukleäre Zellen, 3 Proben von CLL Patienten und eine Probe eines Patienten mit einer varianten Haarzell-Leukämie zwischen 5.000 und >80.000, 7 Knochenmarkproben und 28 PBMNC von Patienten mit follikulärem Lymphom (FL) zwischen 4 und ~100.000 Lymphomzellen. In keinem der Fälle fanden wir mit der SV40-DNA (T-Ag)-spezifischen PCR ein positives Ergebnis. Zusätzlich untersuchte PBMNC Proben von 47 gesunden Spendern und zwei Patienten mit frischer infektiöser Mononukleose (IM) im Alter von 18 und 27 Jahren waren ebenfalls negativ in der SV40-PCR (**Tab.3.4**). Die in PCR-Analysen getesteten Zellmengen lagen basierend auf den Ergebnissen der K-ras PCR in allen Fällen zwischen 200.000 und 700.000 Zellen. 20 von 47 PBMNC Proben waren EBV-DNA (EBNA-1) positiv. Die höchste Kopienzahl fand sich bei den beiden Patienten mit infektiöser Mononukleose (IM): 350 - 850 Kopien pro 100.000 Zellen. Bei allen anderen positiven Personen konnten zwischen 1 und 20 EBV-DNA-Kopien / 100.000 Zellen nachgewiesen werden (**Tab. 3.4**).

**Tab. 3.3. Ergebnisse der quantitativen real- time PCR für den Nachweis des SV40 T-Antigen Gens und der Bestimmung zirkulierender Lymphomzellen**  
 Mononukleäre Zellfraktionen (MNC) wurden aus peripherem Blut (PBMNC) und Knochenmarkproben (KM) von Patienten mit malignen Lymphomen (CLL- chronische lymphatische Leukämie, FL- follikuläres Lymphom, MCL- Mantelzell- Lymphom, HCL - Haarzell-Leukämie) isoliert. Aufgeführt sind Patienteninitialen, Datum der Probeentnahme und Alter des Patienten, histopathologische Diagnose, Ergebnis der quantitativen real- time PCR für zirkulierende Lymphomzellen und Ergebnisse der quantitativen real-time PCR für SV40 - DNA (T-Antigen).

<b>Patient</b>	<b>Datum</b>	<b>Alter (Jahre)</b>	<b>Diagnose</b>	<b>Gewebe</b>	<b>Lymphomzellen/ 100.000 MNC</b>	<b>SV40 DNA (T-Ag)</b>
<b>K.R.</b>	<b>08.07.99</b>	<b>51</b>	<b>CLL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>5.048</b>	<b>neg</b>
<b>A.H.</b>	<b>10.01.00</b>	<b>61</b>	<b>CLL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>39.930</b>	<b>neg</b>
<b>B.J.</b>	<b>19.01.93</b>	<b>65</b>	<b>CLL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>77.732</b>	<b>neg</b>
<b>G.D.</b>	<b>19.11.92</b>	<b>36</b>	<b>FL</b>	<b>KM</b>	<b>121</b>	<b>neg</b>
<b>K.M.</b>	<b>06.02.95</b>	<b>50</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>4</b>	<b>neg</b>
<b>M.R.</b>	<b>16.07.92</b>	<b>48</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>127</b>	<b>neg</b>
<b>M.C.</b>	<b>18.06.91</b>	<b>43</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>1.390</b>	<b>neg</b>
<b>G.G.</b>	<b>08.10.90</b>	<b>53</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>20</b>	<b>neg</b>
<b>S.M.</b>	<b>01.08.91</b>	<b>61</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>143</b>	<b>neg</b>
<b>R.M.</b>	<b>23.09.93</b>	<b>74</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>16.667</b>	<b>neg</b>
<b>G.H.</b>	<b>18.09.92</b>	<b>49</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>71</b>	<b>neg</b>
<b>R.K.</b>	<b>08.01.02</b>	<b>69</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>1.409</b>	<b>neg</b>
<b>S.M.</b>	<b>09.11.00</b>	<b>64</b>	<b>FL</b>	<b>KM</b>	<b>379</b>	<b>neg</b>
<b>T.J.</b>	<b>03.02.00</b>	<b>50</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>45.110</b>	<b>neg</b>
<b>U.V.</b>	<b>08.09.00</b>	<b>46</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>910</b>	<b>neg</b>
<b>V.D.</b>	<b>17.12.01</b>	<b>49</b>	<b>FL</b>	<b>KM</b>	<b>3.745</b>	<b>neg</b>
<b>V.R.</b>	<b>05.10.00</b>	<b>60</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>286</b>	<b>neg</b>
<b>W.E.</b>	<b>31.05.01</b>	<b>45</b>	<b>FL</b>	<b>KM</b>	<b>1.398</b>	<b>neg</b>
<b>Z.C.</b>	<b>19.08.99</b>	<b>60</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>6.031</b>	<b>neg</b>
<b>L.K.</b>	<b>22.01.02</b>	<b>71</b>	<b>FL</b>	<b>KM</b>	<b>2.482</b>	<b>neg</b>
<b>S.A.</b>	<b>13.03.01</b>	<b>60</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>236</b>	<b>neg</b>
<b>L.E.</b>	<b>15.12.92</b>	<b>40</b>	<b>FL</b>	<b>KM</b>	<b>66</b>	<b>neg</b>
<b>H.C.</b>	<b>14.04.99</b>	<b>51</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>4.800</b>	<b>neg</b>
<b>E.S.</b>	<b>22.12.99</b>	<b>71</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>100.000</b>	<b>neg</b>
<b>H.K.</b>	<b>06.03.00</b>	<b>70</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>28.500</b>	<b>neg</b>

<b>P.B.</b>	<b>05.10.00</b>	<b>53</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>2.000</b>	<b>neg</b>
<b>A.A.</b>	<b>24.11.00</b>	<b>52</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>9.100</b>	<b>neg</b>
<b>M.I.</b>	<b>08.03.01</b>	<b>51</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>13.000</b>	<b>neg</b>
<b>B.S.</b>	<b>10.04.01</b>	<b>43</b>	<b>FL</b>	<b>KM</b>	<b>800</b>	<b>neg</b>
<b>B.G.</b>	<b>17.04.01</b>	<b>62</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>5.300</b>	<b>neg</b>
<b>B.L.</b>	<b>01.08.01</b>	<b>38</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>130</b>	<b>neg</b>
<b>K.B.</b>	<b>12.09.01</b>	<b>60</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>66.600</b>	<b>neg</b>
<b>O.B.</b>	<b>27.05.02</b>	<b>52</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>430</b>	<b>neg</b>
<b>G.H.</b>	<b>27.09.02</b>	<b>54</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>540</b>	<b>neg</b>
<b>G.L.</b>	<b>24.10.02</b>	<b>63</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>95.700</b>	<b>neg</b>
<b>G.A.</b>	<b>23.12.02</b>	<b>65</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>34.100</b>	<b>neg</b>
<b>K.B.</b>	<b>26.04.99</b>	<b>57</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>26</b>	<b>neg</b>
<b>B.J.</b>	<b>25.03.99</b>	<b>63</b>	<b>FL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>592</b>	<b>neg</b>
<b>S.H.</b>	<b>30.10.90</b>	<b>60</b>	<b>HCL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>100000</b>	<b>neg</b>
<b>P.M.</b>	<b>18.10.02</b>	<b>68</b>	<b>MCL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>999</b>	<b>neg</b>
<b>S.F.</b>	<b>11.12.00</b>	<b>53</b>	<b>MCL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>3.613</b>	<b>neg</b>
<b>B.M.</b>	<b>02.05.01</b>	<b>71</b>	<b>MCL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>17.245</b>	<b>neg</b>
<b>G.L.</b>	<b>17.04.01</b>	<b>55</b>	<b>MCL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>12.400</b>	<b>neg</b>
<b>B.I.</b>	<b>28.12.01</b>	<b>48</b>	<b>MCL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>9.500</b>	<b>neg</b>
<b>F.E.</b>	<b>07.03.02</b>	<b>63</b>	<b>MCL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>24.900</b>	<b>neg</b>
<b>L.F.</b>	<b>08.07.02</b>	<b>71</b>	<b>MCL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>8.000</b>	<b>neg</b>
<b>D.K.</b>	<b>07.10.97</b>	<b>50</b>	<b>MCL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>100.000</b>	<b>neg</b>
<b>S.H.</b>	<b>08.02.99</b>	<b>69</b>	<b>MCL</b>	<b>PBMNC</b>	<b>9.769</b>	<b>neg</b>

**Tab. 3.4 Ergebnisse der quantitativen real - time PCR für den Nachweis des SV40 T-Antigen Gens und des EBV - EBNA-1 Gens (BKRF1) bei gesunden Freiwilligen**  
 Mononukleäre Zellfraktionen wurden aus den peripheren Blutproben gesunder Freiwilliger isoliert (PBMNC) : aufgeführt sind die Initialen, das Datum der Entnahme, das Alter des gesunden Freiwilligen und die Ergebnisse der quantitativen real- time PCR für das EBV- EBNA-1 Gen (BKRF1) und das SV40 T-Antigen Gen. Die einzelnen Ergebnisse der K-ras PCR sind nicht aufgeführt, da nur die Ergebnisse von Experimenten aufgeführt sind, bei denen pro DNA-Präparation aus den PBMNC in jedem von 5 Einzeltesten eine 1 µg DNA - entsprechend 140.000 Zellen oder ca. 280.000 K-ras Kopien - untersucht wurde. Die Proben B.A. (19.5.04) und B.S. (5.3.91) stammten von Patienten mit einer frischen EBV-assoziierten infektiösen Mononukleose (IM) (grau unterlegt).

gesunde Spender, Initialen	Datum	Alter (Jahre)	Probe	Kopien EBNA1 / 100.000 Zellen	SV40 DNA (T-Ag)
P.S.	30.4.04	28	PBMNC	7	neg
R.A.	30.4.04	21	PBMNC	2	neg
H.S.	11.5.04	31	PBMNC	1	neg
D.J.	11.5.04	22	PBMNC	0	neg
H.N.	11.5.04	23	PBMNC	0	neg
K.S.	11.5.04	22	PBMNC	4	neg
B.C.	11.5.04	21	PBMNC	3	neg
G.K.	12.5.04	24	PBMNC	0	neg
M.M.	13.5.04	29	PBMNC	13	neg
N.K.	13.5.04	23	PBMNC	3	neg
D.S.	17.5.04	22	PBMNC	0	neg
B.C.	17.5.04	22	PBMNC	21	neg
G.A.	17.5.04	23	PBMNC	7	neg
B.A.	19.5.04	27	PBMNC	352	neg
G.	21.6.04	86	PBMNC	14	neg
K.D.	26.2.04	31	PBMNC	0	neg
P.U.	14.11.03	34	PBMNC	0	neg
B.S.	5.3.91	18	PBMNC	856	neg
H.K.	7.5.99	20	PBMNC	0	neg
L.L.	10.5.00	26	PBMNC	3	neg
M.L.	17.7.00	19	PBMNC	6	neg
M.W.	17.1.01	72	PBMNC	0	neg

<b>gesunde Spender, Initialen</b>	<b>Datum</b>	<b>Alter (Jahre)</b>	<b>Probe</b>	<b>Kopien EBNA1 / 100.000 Zellen</b>	<b>SV40 DNA (T-Ag)</b>
W.P.	12.3.01	31	PBMNC	0	neg
I.F.	22.3.01	84	PBMNC	3	neg
B.S.	27.3.01	26	PBMNC	0	neg
S.M.	25.4.01	71	PBMNC	4	neg
S.M.	27.4.01	91	PBMNC	0	neg
L.G.	2.5.01	79	PBMNC	0	neg
M.W.	18.7.01	73	PBMNC	0	neg
B.M.	30.7.01	24	PBMNC	0	neg
Z.M.	15.8.01	19	PBMNC	0	neg
F.D.	27.8.01	21	PBMNC	0	neg
B.C.	12.10.01	23	PBMNC	0	neg
C.P.	3.12.01	27	PBMNC	0	neg
P.K.	9.1.02	25	PBMNC	0	neg
A.R.	11.7.02	21	PBMNC	2	neg
S.R.	28.3.03	23	PBMNC	0	neg
W.P.	8.4.03	33	PBMNC	0	neg
S.F.	28.5.03	18	PBMNC	0	neg
S.F.	25.6.03	18	PBMNC	1	neg
A.F.	24.7.03	33	PBMNC	0	neg
W.T.	4.11.03	25	PBMNC	1	neg
D.C.	25.11.03	19	PBMNC	0	neg
S.S.	2.4.04	27	PBMNC	0	neg
M.G.	5.4.04	22	PBMNC	0	neg
C.M.	17.6.04	28	PBMNC	0	neg
S.S.	8.7.04	31	PBMNC	2	neg

### **3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der quantitativen PCR-Analysen für SV40-DNA und EBV-DNA in Lymphknotengewebe, Milz und peripheren Blutproben von Patienten mit malignen Lymphomen und Kontrollpersonen**

Die **Tab. 3.5.** faßt nochmals alle Ergebnisse der PCR Analysen mit DNA isoliert von 142 menschlichen Gewebs-, Blut- und Knochenmarkproben in einer Übersicht zusammen. SV40 DNA konnte weder in Lymphomgewebe und in peripheren Blutzellen von Lymphompatienten noch in PBMNC und Tumorgewebebiopsien von Kontrollpersonen nachgewiesen werden. Die als Kontrollen für die Amplifizierbarkeit der Zielgene dienenden Gene K-ras Wildtyp, EBV-EBNA-1 und Lymphom-spezifische DNA-Segmente ließen sich ohne Probleme exakt quantifizieren.

#### **Tab. 3.5 Zusammenfassung aller Ergebnisse der quantitativen real-time PCR Analysen an menschlichen Blutzellen und Gewebeproben zum Nachweis eines 111 bp großen DNA-Fragments des SV40 "large" T-Antigen Gens und eines 74 bp Fragments des EBV-BKRF-1 Gens.**

Abkürzungen: CLL - chronische lymphatische Leukämie, FL - follikuläres Lymphom, MCL - Mantelzell-Lymphom; HCL - Haarzell-Leukämie; HL - Hodgkin Lymphom; BFH - benigne follikuläre Hyperplasie. LK -Lymphknoten; KM - Knochenmark; PBMNC - mononukleäre Zellen isoliert aus peripheren Blut.



## 4. Diskussion

### 4.1 Ergebnisse der SV40-T-Antigen DNA Analysen an menschlichen Blut- und Gewebeproben - methodische Aspekte

Die meisten Studien, die Hinweise auf einen Zusammenhang von SV40 mit der Entstehung von menschlichen Tumoren, insbesondere von malignen Lymphomen fanden, stützen sich auf den Nachweis von SV40 DNA mit Hilfe von PCR-Techniken. Im Hinblick auf die beiden Publikationen von Forschungsergebnissen in der Zeitschrift "Lancet" (65, 66) begannen wir unsere Studie mit der Hypothese, daß SV40 direkt in Lymphomzellen nachweisbar sein sollte, falls das Virus eine signifikante Rolle in der Lymphomgenese besitzt. Hierfür etablierten wir eine quantitative real-time PCR für den Nachweis und die Quantifizierung der viralen DNA und wählten als Zielgen das T-Antigen kodierende Gen des SV40 Virus. Wir waren besonders daran interessiert, die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der SV40 DNA mit den Ergebnissen der quantitativen Bestimmung zirkulierender Lymphomzellen bei Patienten mit NHL zu vergleichen, um der Frage nach einer klonalen Beziehung zwischen SV40 und Lymphomzellen nachzugehen.

Die **Tab. 3.5** faßt alle Ergebnisse zusammen. Mit der quantitativen real-time PCR-Technik konnten DNA Sequenzen homolog zu einem 111 bp großen DNA Fragment des SV40 T-Antigen Gens in keiner einzigen DNA Präparation isoliert von Lymphknoten oder Milzgewebe von Patienten mit NHL (n = 27), Morbus Hodgkin (n = 6), von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMNC) und Knochenmarkszellen von 48 NHL Patienten, die zwischen 0,1% und >90% Lymphomzellen enthielten, und von verschiedenen Kontrollgeweben (n = 14) inklusive 47 PBMNC Präparationen von gesunden freiwilligen Probanden nachgewiesen werden.

Zusätzlich waren alle DNA Präparationen auf ihren Gehalt an humanen K-ras Genkopien als Referenz getestet worden. Mit diesem Test bestimmten wir die im Einzeltest eingesetzte DNA Menge, die mindestens 1 µg ~ 280.000 Kopien K-ras betragen sollte, um eine ausreichende Empfindlichkeit des Testsystems (~ getestete Menge DNA ~ Zellzahl) für den Nachweis der SV40 DNA zu erreichen. So konnten auch die Ergebnisse der OD-Messung der isolierten DNA (~ Zell-menge pro Testansatz ~ maximale Empfindlichkeit der PCR ausgedrückt in "Nachweis von Zielkopien pro 100.000 Zellen") mit dem quantitativen PCR-Ergebnis für K-ras korreliert werden (84). Zusätzlich konnte die Amplifizierbarkeit der DNA gezeigt werden, d.h. eine wesentliche Verunreinigung der DNA mit Hemmstoffen der Amplifikation konnte ausgeschlossen werden. Alle verwendeten DNA-Präparationen erfüllten diese Voraussetzungen. Als eine weitere Kontrolle für amplifizierbare virale DNA in den menschlichen DNA-Präparationen wählten wir den quantitativen Nachweis des BKRF1 (EBNA-1) Gens des Epstein-Barr-Virus. Dieses virale Gen konnte durch real-time



PCR in den DNA Präparationen aus den Lymphknoten und Milzgewebeproben von Lymphompatienten und PBMNC von gesunden Kontrollpersonen sehr gut quantifiziert werden. Dies zeigt, daß die isolierte DNA für die quantitative PCR Analyse viraler Gene geeignet war.

Das Testverfahren für die SV40 T-Antigen DNA wurde mit dem Einsatz des klonierten DNA-Fragments und des klonierten kompletten viralen Genoms validiert (**Abb. 3.1.**). Beide Standardkurven zur Quantifizierung waren nahezu identisch, die Effizienz der PCR Amplifikation lag - basierend auf einer statistischen Evaluation der Steigung der Standardkurve - bei 85-95% für alle PCR Teste, die in **Abb. 3.1** gezeigt werden. Eine negative Beeinflussung des Nachweises des SV40 T-Antigen Gens durch hohe Mengen menschlicher DNA konnte experimentell durch den Zusatz von jeweils 1 :g humaner DNA zu den Verdünnungen des SV40-Standards ausgeschlossen werden (**Abb. 3.1.**). Für den Fall, daß SV40 in menschlichen Zellen in episomaler Form vorliegen würde, setzten wir zur Kontrolle der DNA Präparationsmethode aus einer definierten Menge humaner PBMNC in vier Experimenten eine SV40-T-Antigen Gen-enthaltende rekombinante Plasmid DNA von 4 kb in Kopienzahlen zwischen 500 und 100.000 zu und präparierten die DNA mit unserer Standardmethode. Mit dieser DNA Präparationsmethode konnten zwischen 50 und 90% der niedermolekularen DNA wiedergewonnen werden (**Tab. 3.1**), so daß virale SV40 DNA - auch wenn sie in episomaler Form in nur einer Kopie pro Lymphomzelle vorgelegen hätte - mit unserem Testsystem in den DNA-Präparationen aller Gewebe und vor allem auch in den PBMNC mit zirkulierenden Lymphomzellen hätte erkannt werden müssen.

#### **4.2 Gefahr falsch positiver Ergebnisse aufgrund von Kontaminationen mit SV40-DNA-Sequenzen enthaltenden Laborplasmiden**

Im Hinblick auf eine Vielzahl von Studien mit negativen Ergebnissen, darunter auch die Studien von Mackenzie et al. (71) und Capello et al. (72) müssen die Ergebnisse einer neueren Arbeit von Lopez-Rios et al. berücksichtigt werden (96). 71 von diesen Autoren untersuchte Mesotheliome waren in PCR Analysen gerichtet auf unterschiedliche, nicht-T-Antigen-spezifische Sequenzen SV40-negativ, auch konnten immunhistochemisch keine SV40 T-Ag Transkripte nachgewiesen werden. Mit einer PCR für das SV40-T-Antigen (Zielsequenz: Nukleotide 4100 - 4713) konnten die inkonsistenten positiven Ergebnisse mit menschlichen Mesotheliomen jedoch reproduziert werden. Die häufigsten, immer wieder eindeutig nachweisbaren positiven Ergebnisse gingen auf eine Amplifikation von SV40 T-Antigen Regionen zurück, die in Plasmiden vorkommen, die weltweit in Laboratorien genutzt werden. Der Beweis für die Amplifikation von SV40-T-Antigen Sequenzen von Laborplasmiden konnte erbracht werden, da diese Plasmide eine Deletion enthalten, die in natürlichem, funktionsfähigen SV40 Virus nicht vorkommt. Die Schlußfolgerung daraus war,

daß es wichtig ist, für die PCR SV40-Zielgene zu wählen, die keine falsch-positiven Werte ergeben können, falls die Gefahr für eine Kontamination durch im Labor genutzte Plasmide besteht.

Als wir diese Untersuchungen im Jahr 2003 begannen, waren die Ergebnisse dieser im Jahr 2004 publizierten Studie (96) noch nicht bekannt. Wir hatten die bis dahin sehr häufig genutzte Zielsequenz für unsere quantitative PCR vor allem basierend auf der Tatsache ausgesucht, daß eine positive PCR Reaktion mit viraler DNA von anderen Polyomaviren ausgeschlossen werden konnte, da die Fluoreszenzmarkierte Sonde unter den gewählten PCR-Bedingungen nur mit der amplifizierten SV-40 DNA Sequenz hybridisieren konnte. Diese Sequenz stellte sich leider jedoch als ein Teil der SV40 DNA-Sequenz, die in den meisten Laborplasmiden zu finden ist, heraus (96). Glücklicherweise waren sowohl die initialen Arbeitsschritte (Isolierung der mononukleären Zellen, Aliquotierung der Gewebeproben) als auch die Präparation der DNA und die eigentlichen PCR-Experimente in Laboratorien in Greifswald und Freiburg durchgeführt worden, in denen noch nie mit Laborplasmiden, die SV40 Sequenzen enthalten, gearbeitet worden war, und in denen bisher noch keine Forschung mit SV40 stattgefunden hatte.

#### **4.3 Bedeutung von SV40 in der Ätiologie und Pathogenese von malignen Lymphomen: Wertung der molekularen und serologischen Studienergebnisse**

Wir konnten mit einer quantitativen PCR Methode bei deutschen Patienten (Tab. 3.5) (97) keine SV40 T-Antigen DNA Sequenzen in Blutproben mit quantifiziertem Gehalt an Lymphomzellen und in Gewebeproben von Lymphompatienten mit Non-Hodgkin Lymphomen und Hodgkin Lymphomen nachweisen und so die im Jahr 2003 publizierten Daten von MacKenzie et al. aus England (71) und Capello et al. aus Italien und Spanien (72) bestätigen. Auch die Arbeitsgruppe von Brousset et al. (73) fand immunhistochemisch nicht eine einzige SV40 T-Antigen-positive Zelle in 250 Hodgkin Lymphomen und 232 NHL aus Kanada und Frankreich. Unsere negativen Ergebnisse und die negativen Befunde dieser drei Studien stehen in einem gewissen Widerspruch zu den Ergebnissen von zwei amerikanischen Arbeitsgruppen, die in >40% der NHL Gewebe-proben SV40 -T-Antigen - DNA nachweisen konnten, während alle Kontrollen (nicht maligne Lymphknoten und PBMNC) negativ waren (65, 66). Drei frühere Berichte aus den USA hatten Hinweise dafür erbracht, daß SV40 mit einer geringen Frequenz (10 - 15%) in malignen Lymphomen nachgewiesen werden kann (68-70). Dies wurde so interpretiert, daß es eher keine Assoziation zwischen SV40 und malignen Lymphomen gibt. Besonders interessant erscheinen in diesem Zusammenhang die Befunde von Martini et al. (70), daß in 5/18 SV40-positiven Lymphomproben virale DNA nur in <1% der Lymphomzellen, aber in allen 5 Fällen in reaktiven Histozyten nachgewiesen werden konnte. In einer großen Studie aus Japan konnte SV40 DNA mit einer PCR in 11-

19% der malignen Lymphome nachgewiesen werden, andererseits waren aber auch 5% der peripheren Blutproben von gesunden Probanden positiv für SV40 T-Antigen DNA (67).

Die experimentellen Befunde und die Möglichkeit, daß diese unterschiedlichen Ergebnisse wenigstens teilweise auf Kontaminationen mit SV40-DNA Sequenzen von Laborplasmiden zurückgehen könnten (96) wurde bereits diskutiert. Immer wieder erwähnt wird auch eine Hypothese, daß diese unterschiedlichen Ergebnisse mit unterschiedlichen epidemiologischen Bedingungen in den USA, Kanada, Europa und Japan erklärt werden könnten. Die SV40-kontaminierten Impfstoffe wurden jedoch in allen genannten Ländern verwendet. In der schon oben erwähnten japanischen Studie (67), in der 11-19% der malignen NHL und etwa 5% der Proben peripherer Blutzellen von gesunden Freiwilligen PCR-positiv waren, wurden zusätzliche Befunde erhoben, die eine Übertragung von SV40 auf die japanische Bevölkerung in den Jahren um 1960 durch die SV40-kontaminierten Impfstoffe als Ursprung der Infektion in der Bevölkerung als sehr unwahrscheinlich ansehen lassen. NHL-Gewebsproben von japanischen Patienten, die zwischen 1951 und 1963 geboren worden waren, wiesen mit 12% keine höhere Frequenz SV40 positiver Befunde auf, als NHL-Gewebsproben von Patienten, die vor 1950 (11%) oder nach 1964 (15%) geboren wurden.

Ferner gibt es bis heute keine serologischen Beweise dafür, daß SV40 unter natürlichen Bedingungen Menschen infiziert und auch keine serologischen Befunde die dafür sprechen, daß SV40 als ein ätiologischer Faktor in der Entstehung der NHL angesehen werden kann (61, 63, 64, 98-100). Es ist aber darauf hinzuweisen, daß serologische Tests auf Antikörperbildung gegen SV40 und PCR Analysen für SV40-T-Antigen an Lymphomgeweben **nie parallel an Patienten in einer Studie** durchgeführt worden sind.

In einer Bevölkerungs-basierten Fall-Kontroll-Studie (100) aus dem Jahr 2004 wurden Serumproben von 724 NHL Patienten und 622 Kontrollpersonen aus den USA in zwei unabhängigen Laboratorien mit vergleichbaren "virus-like particle (VLP) enzyme immunoassays" auf SV40-Antikörper untersucht. VLPs der menschlichen Polyomaviren BK und JC wurden in kompetitiven Hemmungsexperimenten eingesetzt, um die Spezifität der Reaktivität der Antikörper mit SV40 zu erhärten. Die Resultate der beiden Laboratorien korrelierten sehr gut miteinander: seropositive Befunde für SV40 wurde bei 7,2% und 9,8% der NHL Patienten und bei 10,5% and 9,6% der Kontrollpersonen gefunden. Die SV40-Seropositivität war weder mit einem erhöhten Risiko assoziiert, an einem NHL zu erkranken, noch mit einer spezifischen NHL-Histologie oder einer bestimmten Lokalisation. Da die mit SV40 akzidentell kontaminierten amerikanischen Vakzinen zwischen 1955 und 1962 eingesetzt worden waren, untersuchten die Autoren in einer vergleichenden Analyse Personen, die vor 1963 geboren waren: 1,0% - 1,6% zeigten eine SV40-spezifische Reaktivität. Bei keinem Neugeborenen konnten SV40-spezifische Antikörper nachgewiesen

werden. Daraus läßt sich der Schluß ziehen, daß sich zwar der Nachweis von SV40-spezifischen Antikörpern bei Personen, die vor 1963 geboren wurden, mit einer Exposition mit SV40-kontaminierten Vakzinen vereinbaren läßt, daß aber das NHL-Risiko nicht mit der serologischen Evidenz der SV40 Exposition oder Infektion korreliert.

In einer Populations-basierten Studie der Krebs-Inzidenz der Geburtenjahrgänge von 1943 bis 1997 des dänischen Krebsregisters (64) wurde an drei Kohorten, die sich in ihrer Exposition gegenüber der SV40-Vakzine unterschieden, untersucht, ob die SV40 Infektion das Krebsrisiko für verschiedene menschliche Tumoren, wie Mesothelioma, Ependymome, choroidale Plexus-Tumore, and Non-Hodgkin Lymphoma erhöht. Die Poliovirus Vakzine war den meisten Kindern zwischen 1955 und 1961 verabreicht worden und SV40 DNA Sequenzen waren in allen oben genannten Tumoren nachgewiesen worden. Die Krebsinzidenz wurde in Kindern untersucht, die 0-4 Jahre alt vor, während und nach der Periode der Impfungen mit kontaminierten Vakzinen waren. Nach 69,5 Millionen Personen-Jahren der Nachuntersuchung konnte man feststellen, daß Individuen, die als Kleinkinder (d.h. geboren zwischen 1955 und 1961) oder als Kinder (d.h. geboren zwischen 1946 und 1952) mit der SV40-kontaminierten Poliovirus Vakzine exponiert worden waren, ein niedrigeres Krebsrisiko hatten (Alters-adaptiertes relatives Risiko [RR] = 0,86, 95% Konfidenzintervall [CI] = 0,81 bis 0,91 und RR = 0,79, 95% CI = 0,95 bis 0,84;  $p < 0,001$  für beide) als nicht-exponierte Individuen (d.h. geboren zwischen 1964 und 1970, seit Vakzine ohne SV40-Kontamination eingesetzt wurde). Das bedeutet, da die Exposition mit SV40 nicht mit einer erhöhten Inzidenz von Mesotheliomen, Ependymomen, choroidalen Plexustumoren oder Non-Hodgkin Lymphomen assoziiert ist. Bei Kindern zwischen 0-4 Jahren war nur die Inzidenz der Ependymome (in diesem Studienteil waren auch Leukämien eingeschlossen) während der Expositionsperiode höher im Vergleich zur vorangegangenen Zeit (RR = 2,59, 95% CI = 1,36 bis 4,92;  $p = 0,004$ ). Der Gipfel der Inzidenz lag jedoch im Jahr 1969, d.h. nach dem Abbruch der Verwendung SV40-kontaminierter Impfstoffe. Hieraus läßt sich der Schluß ziehen, daß die Exposition mit einer SV40-kontaminierten Poliovirus Vakzine in Dänemark nicht zu einer erhöhten Krebsrate geführt hat (64).

In einer amerikanischen Studie an Patienten mit Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) (98), die ein erhöhtes Risiko für Non-Hodgkin Lymphome haben, wurde die Assoziation zwischen der SV40 Exposition und dem NHL-Risiko in einer Register-basierten Kohorten Studie von Patienten mit AIDS (1980-96) untersucht. 39.468 zwischen 1958 und 1961 geborene Kinder, die mit der SV40-kontaminierten Vakzine exponiert waren, und 17.340 zwischen 1964 bis 1967 geborene Kontrollen gehörten zum Studienkollektiv. Bei SV40-exponierten AIDS Patienten betrug die NHL Inzidenz 11,7 pro 1.000 Personen-Jahre (616 NHL Fälle) and 10,1 pro 1.000 Personen-Jahre bei nicht-SV40-unexponierten Individuen (230 NHL-Fälle). Das um Alter, Geschlecht, Rasse (Schwarze und Weiße) und Homosexualität korrigierte relative Risiko betrug 0,97 (95% CI 0,79 bis 1,20;  $p = 0,80$ ), d.h. daß die SV40-Exposition im Kindesalter bei AIDS Patienten nicht mit einer erhöhten

Inzidenz von NHL assoziiert ist. Somit zeigen diese Befunde, daß SV40 auch bei immunsupprimierten Personen keine ätiologische Bedeutung für die Lymphomentstehung hat.

Die Mehrzahl der aufgeführten molekularen und serologischen Ergebnisse unterstützt die Hypothese, daß SV40 nicht direkt an der Ätiologie und Pathogenese von malignen Lymphomen beteiligt ist.

## 5. Zusammenfassung

Das Simian Virus 40 (SV40) ist ein sehr potentes DNA Tumovirus. Sein natürliches Infektionsreservoir sind Rhesus Affen (*Maccaca mulatta*) in Nord Indien. Seit seiner Entdeckung im Jahre 1960 in Nierenzellkulturen von Affen, die zur Gewinnung menschlicher Impfstoffe verwendet wurden, gibt es sehr widersprüchliche Befunde bezüglich einer möglichen Rolle des Virus bei der Entstehung verschiedener maligner menschlicher Tumoren. Mit sehr unterschiedlicher Frequenz - zuletzt in zwei amerikanischen Publikationen bei bis zu 40% der Patienten - konnten in einigen Studien bei Patienten mit malignen Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) DNA Sequenzen des "Large T-Antigens" des SV40 mit Hilfe sensitiver PCR-Techniken nachgewiesen werden.

Um festzustellen, ob SV40 DNA Sequenzen auch bei deutschen Patienten in malignen Lymphomzellen zu finden sind, und ob eine klonale Beziehung zwischen Virus und Tumorzelle besteht, untersuchten wir malignes Lymphomgewebe von 27 Patienten mit NHL und 6 Patienten mit Hodgkin Lymphomen, periphere mononukleäre Zellen (PBMNC) mit quantitativ bestimmtem Lymphomzellgehalt von 47 Patienten mit NHL und 61 Kontrollen, 14 Lymphknoten ohne Lymphombefall und 46 PBMNC von gesunden Freiwilligen. Für den Nachweis von SV40-DNA-Sequenzen etablierten wir eine hoch-sensitive quantitative real-time PCR für das SV40 "Large-T-Antigen" Gen, um den direkten qualitativen und quantitativen Nachweis von SV40 DNA-Kopien an Blut, Knochenmark und lymphatischem Gewebe von Patienten mit malignen Lymphomen und Kontrollpersonen zu ermöglichen. Um zu gewährleisten, daß virale DNA von BK- und JC-Virus nicht zu falsch positiven PCR Ergebnissen führen konnte, wurde für die real-time PCR nach dem Taqman-Prinzip eine Fluoreszenzsonde ausgewählt, die ausschließlich mit SV40-DNA reagieren kann. In den peripheren Blutproben der NHL Patienten waren zirkulierende Lymphomzellen über den Nachweis Lymphom-spezifischer Translokationen, wie z.B. der t(14;18) und t(11;14) Translokation, bzw. über das klonale VDJ- Rearrangement des IgH-Locus quantitativ bestimmt worden. Um die Intaktheit und Amplifizierbarkeit der isolierten zellulären DNA festzustellen, wurden die Proben auf EBV und K-ras getestet. Das K-ras Gen diente außerdem als Referenzgen, um den Gehalt zellulärer DNA, ausgedrückt in Genkopien zellulärer DNA (2 Genkopien K-ras/Zelle), im Einzeltest zu bestimmen. Durch den Vergleich der quantitativen Bestimmung der zirkulierenden Lymphomzellen und der SV40 Genomkopien wäre es im positiven Fall möglich, die Frage nach einer direkten Assoziation von SV40 mit den Tumorzellen maligner Lymphome zu beantworten. Keine der 47 Lymphknotenproben enthielt SV40 DNA bei einer Sensitivität von 1-3 Kopien in 50.000 bis 100.000 Zellen. Auch konnten keine SV40 DNA Sequenzen in den DNA Proben, die von PBMNC von 47 NHL Patienten isoliert worden waren und zwischen 0,1% und >90% Lymphomzellen enthielten, nachgewiesen werden. Zum Vergleich waren 30/46 (65,2%) der Proben positiv für EBV-DNA: sie enthielten zwischen 5 und 82.800 EBV Kopien pro

100.000 Zellen, ein Beweis für die Möglichkeit, an den isolierten DNA-Präparationen virale DNA-Kopien zu quantifizieren.

Diese Ergebnisse schließen eine direkte klonale Assoziation des SV40 Virus mit malignen Lymphomzellen in allen untersuchten Proben aus. In Übereinstimmung mit neueren Daten aus Italien, Spanien, England, Frankreich und Kanada sprechen auch unsere Ergebnisse dafür, daß SV40 keine wesentliche Rolle bei der Ätiologie und Pathogenese maligner Lymphome spielt.

## 6. Literatur

- 1 Sweet,B.H. and Hillemann,M.R. The vacuolating virus, S.V. 40, Proc.Soc.Exp.Biol.Med., *105*: 420-427, 1960.
- 2 Melnick,J.L. and Stinebaugh,S. Excretion of vacuolating SV-40 virus (papova virus group) after ingestion as a contaminant of oral poliovaccine, Proc.Soc.Exp.Biol.Med., *109*: 965-968, 1962.
- 3 Shah,K. and Nathanson,N. Human exposure to SV40: review and comment, Am.J.Epidemiol., *103*: 1-12, 1976.
- 4 Morris,J.A., Johnson,K.M., Aulisio,C.G., Chanock,R.M. and Knight,V. Clinical and serologic responses in volunteers given vacuolating virus (SV-40) by respiratory route, Proc.Soc.Exp.Biol.Med., *108*: 56-59, 1961.
- 5 Cole,C.N. and Conzen,S.D. Polyomaviridae: The viruses and their replication. In: D. M. Knipe and P. M. Howley (eds.), Fields Virology, pp. 2141-2229. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2001.
- 6 Pipas,J.M. Common and unique features of T antigens encoded by the polyomavirus group, J.Virol., *66*: 3979-3985, 1992.
- 7 Ilyinskii,P.O., Daniel,M.D., Horvath,C.J. and Desrosiers,R.C. Genetic analysis of simian virus 40 from brains and kidneys of macaque monkeys, J.Virol., *66*: 6353-6360, 1992.
- 8 Lednicky,J.A., Arrington,A.S., Stewart,A.R., Dai,X.M., Wong,C., Jafar,S., Murphey-Corb,M. and Butel,J.S. Natural isolates of simian virus 40 from immunocompromised monkeys display extensive genetic heterogeneity: new implications for polyomavirus disease, J.Virol., *72*: 3980-3990, 1998.
- 9 Newman,J.S., Baskin,G.B. and Frisque,R.J. Identification of SV40 in brain, kidney and urine of healthy and SIV-infected rhesus monkeys, J.Neurovirol., *4*: 394-406, 1998.
- 10 Stewart,A.R., Lednicky,J.A. and Butel,J.S. Sequence analyses of human tumor-associated SV40 DNAs and SV40 viral isolates from monkeys and humans, J.Neurovirol., *4*: 182-193, 1998.



- 11 Lednicky,J.A., Wong,C. and Butel,J.S. Artificial modification of the viral regulatory region improves tissue culture growth of SV40 strain 776, *Virus Res.*, 35: 143-153, 1995.
- 12 Ray,F.A., Peabody,D.S., Cooper,J.L., Cram,L.S. and Kraemer,P.M. SV40 T antigen alone drives karyotype instability that precedes neoplastic transformation of human diploid fibroblasts, *J.Cell Biochem.*, 42: 13-31, 1990.
- 13 Stewart,N. and Bacchetti,S. Expression of SV40 large T antigen, but not small t antigen, is required for the induction of chromosomal aberrations in transformed human cells, *Virology*, 180: 49-57, 1991.
- 14 Fanning,E. and Knippers,R. Structure and function of simian virus 40 large tumor antigen, *Annu.Rev.Biochem.*, 61: 55-85, 1992.
- 15 Ludlow,J.W. Interactions between SV40 large-tumor antigen and the growth suppressor proteins pRB and p53, *FASEB J.*, 7: 866-871, 1993.
- 16 De,L.A., Baldi,A., Esposito,V., Howard,C.M., Bagella,L., Rizzo,P., Caputi,M., Pass,H.I., Giordano,G.G., Baldi,F., Carbone,M. and Giordano,A. The retinoblastoma gene family pRb/p105, p107, pRb2/p130 and simian virus-40 large T-antigen in human mesotheliomas, *Nat.Med.*, 3: 913-916, 1997.
- 17 Carbone,M., Rizzo,P., Grimley,P.M., Procopio,A., Mew,D.J., Shridhar,V., de,B.A., Esposito,V., Giuliano,M.T., Steinberg,S.M., Levine,A.S., Giordano,A. and Pass,H.I. Simian virus-40 large-T antigen binds p53 in human mesotheliomas, *Nat.Med.*, 3: 908-912, 1997.
- 18 Fraumeni,J.F., Jr., Ederer,F. and Miller,R.W. An evaluation of the carcinogenicity of simian virus 40 in man, *JAMA*, 185: 713-718, 1963.
- 19 Eddy,B.E., Bormann,G.S., Grubbs,G.E. and Young,R.D. Identification of the oncogenic substance in rhesus monkey kidney cell culture as simian virus 40, *Virology*, 17: 65-75, 1962.
- 20 Girardi,A.J., Sweet,B.H., Slotnick,V.B. and Hilleman,M.R. Development of tumors in hamsters inoculated in the neonatal period with vacuolating virus, SV-40, *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, 109: 649-660, 1962.
- 21 Butel,J.S., Tevethia,S.S. and Melnick,J.L. Oncogenicity and cell transformation by

papovavirus SV40: the role of the viral genome, *Adv.Cancer Res.*, *15*: 1-55, 1972.

22 Kirschstein,R.L. and Gerber,P. Ependymomas produced after intracerebral inoculation of SV40 into new-born hamsters, *Nature*, *195*: 299-300, 1962.

23 Diamandopoulos,G.T. Induction of lymphocytic leukemia, lymphosarcoma, reticulum cell sarcoma, and osteogenic sarcoma in the Syrian golden hamster by oncogenic DNA simian virus 40, *J.Natl.Cancer Inst.*, *50*: 1347-1365, 1973.

24 Diamandopoulos,G.T. and Sanborn-Redmond,S. Adenovirus-like transformation of hamster embryo cells mediated by Simian virus 40, *Am.J.Pathol.*, *71*: 81-92, 1973.

25 Cicala,C., Pompetti,F. and Carbone,M. SV40 induces mesotheliomas in hamsters, *Am.J.Pathol.*, *142*: 1524-1533, 1993.

26 Carbone,M., Rizzo,P. and Pass,H.I. Simian virus 40, poliovaccines and human tumors: a review of recent developments, *Oncogene*, *15*: 1877-1888, 1997.

27 Monini,P., De Lellis,L. and Barnanti-Brodano,G. Association of BK and JC human polyomaviruses and SV40 with human tumors. *In*: G. Barnanti-Brodano, M. Bendinelli and H. Friedman (eds.), *DNA Tumor Viruses. Oncogenic Mechanisms*, pp. 51-73. Plenum Press: New York, 1995.

28 Bergsagel,D.J., Finegold,M.J., Butel,J.S., Kupsky,W.J. and Garcea,R.L. DNA sequences similar to those of simian virus 40 in ependymomas and choroid plexus tumors of childhood, *N.Engl.J.Med.*, *326*: 988-993, 1992.

29 Lednicky,J.A., Garcea,R.L., Bergsagel,D.J. and Butel,J.S. Natural simian virus 40 strains are present in human choroid plexus and ependymoma tumors, *Virology*, *212*: 710-717, 1995.

30 Martini,F., Iaccheri,L., Lazzarin,L., Carinci,P., Corallini,A., Gerosa,M., Iuzzolino,P., Barbanti-Brodano,G. and Tognon,M. SV40 early region and large T antigen in human brain tumors, peripheral blood cells, and sperm fluids from healthy individuals, *Cancer Res.*, *56*: 4820-4825, 1996.

31 Huang,H., Reis,R., Yonekawa,Y., Lopes,J.M., Kleihues,P. and Ohgaki,H. Identification in human brain tumors of DNA sequences specific for SV40 large T antigen, *Brain Pathol.*,

9: 33-42, 1999.

32 Galateau-Salle,F., Bidet,P., Iwatsubo,Y., Gennetay,E., Renier,A., Letourneux,M., Paireon,J.C., Moritz,S., Brochard,P., Jaurand,M.C. and Freymuth,F. SV40-like DNA sequences in pleural mesothelioma, bronchopulmonary carcinoma, and non-malignant pulmonary diseases, *J.Pathol.*, *184*: 252-257, 1998.

33 Carbone,M., Pass,H.I., Rizzo,P., Marinetti,M., Di,M.M., Mew,D.J., Levine,A.S. and Procopio,A. Simian virus 40-like DNA sequences in human pleural mesothelioma, *Oncogene*, *9*: 1781-1790, 1994.

34 Pepper,C., Jasani,B., Navabi,H., Wynford-Thomas,D. and Gibbs,A.R. Simian virus 40 large T antigen (SV40LTAg) primer specific DNA amplification in human pleural mesothelioma tissue, *Thorax*, *51*: 1074-1076, 1996.

35 Cristaudo,A., Vivaldi,A., Sensales,G., Guglielmi,G., Ciancia,E., Elisei,R. and Ottenga,F. Molecular biology studies on mesothelioma tumor samples: preliminary data on H-ras, p21, and SV40, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, *14*: 29-34, 1995.

36 Carbone,M., Rizzo,P., Procopio,A., Giuliano,M., Pass,H.I., Gebhardt,M.C., Mangham,C., Hansen,M., Malkin,D.F., Bushart,G., Pompetti,F., Picci,P., Levine,A.S., Bergsagel,J.D. and Garcea,R.L. SV40-like sequences in human bone tumors, *Oncogene*, *13*: 527-535, 1996.

37 Lednický,J.A., Stewart,A.R., Jenkins,J.J., III, Finegold,M.J. and Butel,J.S. SV40 DNA in human osteosarcomas shows sequence variation among T-antigen genes, *Int.J.Cancer*, *72*: 791-800, 1997.

38 Krainer,M., Schenk,T., Zielinski,C.C. and Muller,C. Failure to confirm presence of SV40 sequences in human tumours, *Eur.J.Cancer*, *31A*: 1893, 1995.

39 Volter,C., Hausen,H., Alber,D. and de Villiers,E.M. Screening human tumor samples with a broad-spectrum polymerase chain reaction method for the detection of polyomaviruses, *Virology*, *237*: 389-396, 1997.

40 Smith,M.A., Strickler,H.D., Granovsky,M., Reaman,G., Linet,M., Daniel,R. and Shah,K.V. Investigation of leukemia cells from children with common acute lymphoblastic leukemia for genomic sequences of the primate polyomaviruses JC virus, BK virus, and

simian virus 40, *Med.Pediatr.Oncol.*, 33: 441-443, 1999.

41 Scherneck,S., Rudolph,M., Geissler,E., Vogel,F., Lubbe,L., Wahlte,H., Nisch,G., Weickmann,F. and Zimmermann,W. Isolation of a SV40-like Papovavirus from a human glioblastoma, *Int.J.Cancer*, 24: 523-531, 1979.

42 Krieg,P., Amtmann,E., Jonas,D., Fischer,H., Zang,K. and Sauer,G. Episomal simian virus 40 genomes in human brain tumors, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 78: 6446-6450, 1981.

43 Geissler,E. SV40 and human brain tumors, *Prog.Med.Virol.*, 37: 211-222, 1990.

44 Meinke,W., Goldstein,D.A. and Smith,R.A. Simian virus 40-related DNA sequences in a human brain tumor, *Neurology*, 29: 1590-1594, 1979.

45 Soriano,F., Shelburne,C.E. and Gokcen,M. Simian virus 40 in a human cancer, *Nature*, 249: 421-424, 1974.

46 Weiss,A.F., Portmann,R., Fischer,H., Simon,J. and Zang,K.D. Simian virus 40-related antigens in three human meningiomas with defined chromosome loss, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 72: 609-613, 1975.

47 Zimmermann,W., Schernick,S., Geissler,E. and Nisch,G. Demonstration of SV40-related tumour antigen in human meningiomas by different hamster SV40-T-antisera, *Acta Virol.*, 25: 199-204, 1981.

48 Greenlee,J.E., Becker,L.E., Narayan,O. and Johnson,R.T. Failure to demonstrate papovavirus tumor antigen in human cerebral neoplasms, *Ann.Neurol.*, 3: 479-481, 1978.

49 Kosaka,H., Sano,Y., Matsukado,Y., Sairenji,T. and Hinuma,Y. Failure to detect papovavirus-associated T antigens in human brain tumor cells by anticomplement immunofluorescence, *J.Neurosurg.*, 52: 367-370, 1980.

50 Dorries,K., Loeber,G. and Meixensberger,J. Association of polyomaviruses JC, SV40, and BK with human brain tumors, *Virology*, 160: 268-270, 1987.

51 Chauvin,C., Suh,M., Remy,C. and Benabid,A.L. Failure to detect viral genomic sequences of three viruses (herpes simplex, simian virus 40 and adenovirus) in human and rat brain tumors, *Ital.J.Neurol.Sci.*, 11: 347-357, 1990.

- 52 Strickler,H.D., Goedert,J.J., Fleming,M., Travis,W.D., Williams,A.E., Rabkin,C.S., Daniel,R.W. and Shah,K.V. Simian virus 40 and pleural mesothelioma in humans, *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, 5: 473-475, 1996.
- 53 Pepper,C., Jasani,B., Navabi,H., Wynford-Thomas,D. and Gibbs,A.R. Simian virus 40 large T antigen (SV40LTA) primer specific DNA amplification in human pleural mesothelioma tissue, *Thorax*, 51: 1074-1076, 1996.
- 54 Carbone,M., Rizzo,P., Grimley,P.M., Procopio,A., Mew,D.J., Shridhar,V., de Bartolomeis,A., Esposito,V., Giuliano,M.T., Steinberg,S.M., Levine,A.S., Giordano,A. and Pass,H.I. Simian virus-40 large-T antigen binds p53 in human mesotheliomas, *Nat.Med.*, 3: 908-912, 1997.
- 55 Testa,J.R., Carbone,M., Hirvonen,A., Khalili,K., Krynska,B., Linnainmaa,K., Pooley,F.D., Rizzo,P., Rusch,V. and Xiao,G.H. A multi-institutional study confirms the presence and expression of simian virus 40 in human malignant mesotheliomas, *Cancer Res.*, 58: 4505-4509, 1998.
- 56 Strickler,H.D., Goedert,J.J., Bueno,R., Butel,J.S., Daniel,R., de Villiers,E.M., Freymuth,F., Gibbs,A., Griffiths,D.J., Jablons,D., Jasani,B., Jones,C., Lednicky,J.A., Miller,C.W., Radu,C., Richards,W.G., Shah,K.V., You,L., Corson,J.M., Gerwin,B., Harris,C., Sugarbaker,D.J., Egan,W., Lewis,A.M., Krause,P.R., Peden,K., Levine,A.S., Melnick,S., Cosentino,M., da Costa,M., Devairrakam,V., Ji,J., Palefsky,J., Rasmussen,L., Shea,K., Wacholder,S., Waters,D. and Wright,T. A multicenter evaluation of assays for detection of SV40 DNA and results in masked mesothelioma specimens, *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, 10: 523-532, 2001.
- 57 Jasani,B., Cristaudo,A., Emri,S.A., Gazdar,A.F., Gibbs,A., Krynska,B., Miller,C., Mutti,L., Radu,C., Tognon,M. and Procopio,A. Association of SV40 with human tumours, *Semin.Cancer Biol.*, 11: 49-61, 2001.
- 58 Klein,G., Powers,A. and Croce,C. Association of SV40 with human tumors, *Oncogene*, 21: 1141-1149, 2002.
- 59 Gazdar,A.F., Butel,J.S. and Carbone,M. SV40 and human tumours: myth, association or causality?, *Nat.Rev.Cancer*, 2: 957-964, 2002.
- 60 Strickler,H.D., Goedert,J.J., Devesa,S.S., Lahey,J., Fraumeni,J.F., Jr. and

Rosenberg,P.S. Trends in U.S. pleural mesothelioma incidence rates following simian virus 40 contamination of early poliovirus vaccines, *J.Natl.Cancer Inst.*, 95: 38-45, 2003.

61 Knowles,W.A., Pipkin,P., Andrews,N., Vyse,A., Minor,P., Brown,D.W. and Miller,E. Population-based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40, *J.Med.Virol.*, 71: 115-123, 2003.

62 Rollison,D.E., Helzlsouer,K.J., Alberg,A.J., Hoffman,S., Hou,J., Daniel,R., Shah,K.V. and Major,E.O. Serum antibodies to JC virus, BK virus, simian virus 40, and the risk of incident adult astrocytic brain tumors, *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, 12: 460-463, 2003.

63 de Sanjose,S., Shah,K.V., Domingo-Domenech,E., Engels,E.A., Fernandez,d.S., Alvaro,T., Garcia-Villanueva,M., Romagosa,V., Gonzalez-Barca,E. and Viscidi,R.P. Lack of serological evidence for an association between simian virus 40 and lymphoma, *Int.J.Cancer*, 104: 522-524, 2003.

64 Engels,E.A., Katki,H.A., Nielsen,N.M., Winther,J.F., Hjalgrim,H., Gjerris,F., Rosenberg,P.S. and Frisch,M. Cancer incidence in Denmark following exposure to poliovirus vaccine contaminated with simian virus 40, *J.Natl.Cancer Inst.*, 95: 532-539, 2003.

65 Shivapurkar,N., Harada,K., Reddy,J., Scheuermann,R.H., Xu,Y., McKenna,R.W., Milchgrub,S., Kroft,S.H., Feng,Z. and Gazdar,A.F. Presence of simian virus 40 DNA sequences in human lymphomas, *Lancet*, 359: 851-852, 2002.

66 Vilchez,R.A., Madden,C.R., Kozinetz,C.A., Halvorson,S.J., White,Z.S., Jorgensen,J.L., Finch,C.J. and Butel,J.S. Association between simian virus 40 and non-Hodgkin lymphoma, *Lancet*, 359: 817-823, 2002.

67 Nakatsuka,S., Liu,A., Dong,Z., Nomura,S., Takakuwa,T., Miyazato,H. and Aozasa,K. Simian virus 40 sequences in malignant lymphomas in Japan, *Cancer Res.*, 63: 7606-7608, 2003.

68 David,H., Mendoza,S., Konishi,T. and Miller,C.W. Simian virus 40 is present in human lymphomas and normal blood, *Cancer Lett.*, 162: 57-64, 2001.

69 Rizzo,P., Carbone,M., Fisher,S.G., Matker,C., Swinnen,L.J., Powers,A., Di,R., I, Alkan,S., Pass,H.I. and Fisher,R.I. Simian virus 40 is present in most United States human

mesotheliomas, but it is rarely present in non-Hodgkin's lymphoma, *Chest*, *116*: 470S-473S, 1999.

70 Martini,F., Dolcetti,R., Gloghini,A., Iaccheri,L., Carbone,A., Boiocchi,M. and Tognon,M. Simian-virus-40 footprints in human lymphoproliferative disorders of HIV- and HIV+ patients, *Int.J.Cancer*, *78*: 669-674, 1998.

71 MacKenzie,J., Wilson,K.S., Perry,J., Gallagher,A. and Jarrett,R.F. Association between simian virus 40 DNA and lymphoma in the United kingdom, *J.Natl.Cancer Inst.*, *95*: 1001-1003, 2003.

72 Capello,D., Rossi,D., Gaudino,G., Carbone,A. and Gaidano,G. Simian virus 40 infection in lymphoproliferative disorders, *Lancet*, *361*: 1565-1566, 2003.

73 Brousset,P., de,A., V and Gascoyne,R.D. Immunohistochemical investigation of SV40 large T antigen in Hodgkin and non-Hodgkin's lymphoma, *Int.J.Cancer*, *112*: 533-535, 2004.

74 Harris,N.L., Jaffe,E.S., Diebold,J., Flandrin,G., Muller-Hermelink,H.K., Vardiman,J., Lister,T.A. and Bloomfield,C.D. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997, *J.Clin.Oncol.*, *17*: 3835-3849, 1999.

75 Lennert,K. [Non-Hodgkin's lymphomas: principles and application of the Kiel classification], *Verh.Dtsch.Ges.Pathol.*, *76*: 1-13, 1992.

76 Harris,N.L., Jaffe,E.S., Stein,H., Banks,P.M., Chan,J.K.C., Cleary,M.L., Delsol,G., De Wolf-Peeters,C., Falini,B., Gatter,K.C., Grogan,T.M., Isaacson,P.G., Knowles,D.M., Mason,D.Y., Muller-Hermelink,H.-K., Pileri,S.A., Piris,M.A., Ralfkiaer,E. and Warnke,R.A. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the International Lymphoma Study Group, *Blood*, *84*: 1361-1392, 1994.

77 Dyer,M.J., Fischer,P., Nacheva,E., Labastide,W. and Karpas,A. A new human B-cell non-Hodgkin's lymphoma cell line (Karpas 422) exhibiting both t(14;18) and t(4;11) chromosomal translocations, *Blood*, *75*: 709-714, 1990.

78 Saiki,R.K., Scharf,S., Faloona,F., Mullis,K.B., Horn,G.T., Erlich,H.A. and Arnheim,N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for

diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, 230: 1350-1354, 1985.

79 Savitz,D.A. and Andrews,K.W. Review of epidemiologic evidence on benzene and lymphatic and hematopoietic cancers, *Am.J.Ind.Med.*, 31: 287-295, 1997.

80 Lee,L.G., Connel,C.R. and Bloch,W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes, *Nucleic Acids Res.*, 21: 3761-3766, 1993.

81 Förster,V.Th. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz, *Ann.Phys.(Leipzig)*, 2: 55-75, 1948.

82 Heid,C.A., Stevens,J., Livak,K.J. and Williams,P.M. Real time quantitative PCR, *Genome Res*, 6: 986-994, 1996.

83 Gibson,U.E.M., Heid,C.A. and Williams,P.M. A novel method for real time quantitative RT PCR, *Genome Res*, 6: 995-1001, 1996.

84 Dölken,L., Schüler,F. and Dölken,G. Quantitative detection of t(14;18)-positive cells by real-time quantitative PCR using fluorogenic probes, *BioTechniques*, 25: 1058-1064, 1998.

85 Finke,J., Fritzen,R., Ternes,P., Trivedi,P., Bross,K.J., Lange,W., Mertelsmann,R. and Dölken,G. Expression of bcl-2 in Burkitt's lymphoma cell lines: Induction by latent Epstein-Barr virus genes, *Blood*, 80: 459-469, 1992.

86 Hirt,C., Schüler,F., Dölken,L., Schmidt,C.A. and Dölken,G. Low prevalence of circulating t(11;14)(q13;q32)-positive cells in the peripheral blood of healthy individuals as detected by real-time quantitative PCR, *Blood*, 104: 904-905, 2004.

87 Donovan,J.W., Ladetto,M., Zou,G., Neuberg,D., Poor,C., Bowers,D. and Gribben,J.G. Immunoglobulin heavy-chain consensus probes for real-time PCR quantification of residual disease in acute lymphoblastic leukemia, *Blood*, 95: 2651-2658, 2000.

88 Dölken,G. Detection of minimal residual disease, *Adv.Cancer Res.*, 82: 133-185, 2001.

89 Matsuda,F., Ishii,K., Bourvagnet,P., Kuma,K., Hayashida,H., Miyata,T. and Honjo,T. The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus, *J.Exp.Med.*, 188: 2151-2162, 1998.



- 90 Corbett,S.J., Tomlinson,I.M., Sonnhammer,E.L., Buck,D. and Winter,G. Sequence of the human immunoglobulin diversity (D) segment locus: a systematic analysis provides no evidence for the use of DIR segments, inverted D segments, "minor" D segments or D-D recombination, *J.Mol.Biol.*, 270: 587-597, 1997.
- 91 Ravetch,J.V., Siebenlist,U., Korsmeyer,S.J., Waldmann,T.A. and Leder,P. Structure of the human immunoglobulin m locus: characterization of embryonic and rearranged J and D genes, *Cell*, 27: 583-591, 1981.
- 92 Kwok,S. and Higuchi,R. Avoiding false positives with PCR, *Nature*, 339: 237-238, 1989.
- 93 Longo,M.C., Berninger,M.S. and Hartley,J.L. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions, *Gene*, 93: 125-128, 1990.
- 94 Sanger,F., Nicklen,S. and Coulson,A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Genomics*, 9: 219-228, 1977.
- 95 Macken,C. Design and analysis of serial limiting dilution assays with small sample sizes, *J.Immunol.Methods*, 222: 13-29, 1999.
- 96 Lopez-Rios,F., Illei,P.B., Rusch,V. and Ladanyi,M. Evidence against a role for SV40 infection in human mesotheliomas and high risk of false-positive PCR results owing to presence of SV40 sequences in common laboratory plasmids, *Lancet*, 364: 1157-1166, 2004.
- 97 Schüler,F., Dölken,S.C., Hirt,C., Dölken,M.T., Mentel,R., Gürtler,L.G. and Dölken,G. No evidence for simian virus 40 DNA sequences in malignant non-Hodgkin lymphomas, *Int.J.Cancer*, 118: 498-504, 2005.
- 98 Engels,E.A., Rodman,L.H., Frisch,M., Goedert,J.J. and Biggar,R.J. Childhood exposure to simian virus 40-contaminated poliovirus vaccine and risk of AIDS-associated non-Hodgkin's lymphoma, *Int.J.Cancer*, 106: 283-287, 2003.
- 99 Carter,J.J., Madeleine,M.M., Wipf,G.C., Garcea,R.L., Pipkin,P.A., Minor,P.D. and Galloway,D.A. Lack of serologic evidence for prevalent simian virus 40 infection in humans, *J.Natl.Cancer Inst.*, 95: 1522-1530, 2003.

100 Engels,E.A., Viscidi,R.P., Galloway,D.A., Carter,J.J., Cerhan,J.R., Davis,S., Cozen,W., Severson,R.K., de Sanjose,S., Colt,J.S. and Hartge,P. Case-control study of simian virus 40 and non-Hodgkin lymphoma in the United States, *J.Natl.Cancer Inst.*, 96: 1368-1374, 2004.

## **7. Appendix**

### **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei den medizinisch-technischen Assistentinnen, Frau Meier und Frau Pett, und bei allen Mitarbeitern der Klinik für Innere Medizin C, Abteilung Hämatologie und Onkologie, der Ernst-Moritz-Arndt Universität, für ihre Unterstützung bei dieser Arbeit, insbesondere der Einarbeitung in eine kontaminationsfreie PCR Technologie, bedanken.

Besonderer Dank gilt den Betreuern meiner Dissertation, Dr. Frank Schüler und meinem Vater, für ihre Hilfe bei der Einarbeitung in dieses wissenschaftlich schwierige und äußerst kontrovers diskutierte Thema der Tumorstammscheitelvirologie.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Diese Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, daß ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und daß eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Greifswald, den 15.03.2007

Sandra Dölken

# Curriculum Vitae

## A. Persönliche Daten

**Name:** Sandra Dölken

**Adresse:** Fritz- Reuter- Weg 11  
D- 17509 Lubmin  
Deutschland  
Tel: (0049) 038354 / 22950  
Fax: (0049)038354 / 22952  
e-mail: sandradoelken@msn.com

**Geburtsdatum:** 12.03.1982

**Geburtsort :** Freiburg im Breisgau

**Staatsangehörigkeit:** deutsch

**Vater / Beruf:** Gottfried Dölken, Prof. Dr. med., Med. Direktor der Klinik für Innere Med.C, Hämatologie und Onkologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

**Mutter / Beruf:** Elke Dölken, Dr. med., Ärztin

**Konfession:** röm. kath.

## B. Ausbildung

Von 1985 bis 1987 wohnte unsere Familie in Arcadia, Los Angeles, USA.

**Grundschule:** Grundschule Sölden, Freiburg im Breisgau, 1988-1992

**Gymnasium:** Rotteck-Gymnasium Freiburg im Breisgau, 1992-1996  
Friedrich-Ludwig-Jahn Gymnasium, Greifswald, 1996-2000  
Abitur, Juli 2000

**Studium:** Humanmedizin seit Oktober 2000 an der Ernst-Moritz-Arndt  
Universität Greifswald

**Examina:** **Physikum:** September 2002 an der Universität Greifswald  
.  
**1. Staatsexamen:** August 2003 an der Universität Greifswald  
.  
**2. Staatsexamen:** März 2006 an der Universität Greifswald  
.  
**3. Staatsexamen:** Mai 2007 an der Universität Greifswald  
**Praktisches Jahr:** April 2006 bis März 2007  
1. Terial: Medizinische Genetik (University of Newcastle upon Tyne,  
England)  
2. Terial: Chirurgie (Universitätsklinikum Greifswald)  
3. Terial: Innere Medizin (Universitätsklinikum Greifswald,  
Endokrinologie/ Hämatologie und Onkologie)

**besondere Interessen:** Musik: Ich spiele seit 16 Jahren Klavier und seit 8 Jahren  
Querflöte

Sport: Schwimmen, Windsurfen, Tennis, Badminton,  
klassisches und lateinamerikanisches Tanzen

Jagd/Angeln: vor 8 Jahren habe ich die Jagdscheinprüfung abgelegt

Greifswald, den 15.03.2007

Sandra Dölken