

Die Verwendung verschiedener Nukleinsäure-Hybridisierungstechniken am Beispiel von Epstein-Barr-Virus korrelierter Erkrankungen

**The use of nucleic acid hybridization exemplified with Epstein-Barr virus-associated diseases
(Referat · report)**

H. WOLF

Max von Pettenkofer-Institut, Universität München

Mit 6 Abbildungen

Summary

The search for viral antigens in latent infections or virus-associated tumor cells is often not successful. Techniques have been developed which allow the direct detection of viral nucleic acid sequences in a vast excess of cellular nucleic acids. Nucleic acid hybridization techniques can be adopted to achieve highest sensitivity for the detection of rare sequences, for availability for rapid screening tests or, in case of the *in situ* hybridization, for the correlation of hybridization data with specific cell types. Application and principles of these techniques are explained in connection with Epstein-Barr virus-associated tumors.

Ein Teil der erwähnten Ergebnisse wurde mit Unterstützung der DFG (Wo 227/2 und SFB 51) erarbeitet.

Es gibt im wesentlichen zwei klassische Methoden zur Identifizierung von Mikroorganismen oder Viren in Verbindung mit bestimmten Erkrankungen. Die erste Methode ist die Isolierung des Erregers wie dieses z. B. bei den Herpesviren häufig erfolgt. Hierzu zählt im weiteren Sinne auch die Identifizierung von entsprechenden Antigenen. Dies ist vor allem bei der Diagnose der viralen Hepatitis von Bedeutung. Beide Untersuchungen sind häufig auf die Frühphase der Erkrankung oder auf eine begrenzte Zahl von chronischen Trägern beschränkt. Im weiteren Verlauf einer Erkrankung und in der Rekonvaleszenz können spezifische Antikörper getestet und diagnostisch ausgewertet werden. Die Untersuchung von Seren auf ihren Gehalt an spezifischen Antikörpern ist die zweite der klassischen diagnostischen Möglichkeiten.

Die angeführten Methoden geben oft wenig Hilfe bei Untersuchungen zur Latenz oder bei Erkrankungen, die mit der Anwesenheit von Viren ohne virale Replikation korreliert sind. In diesen Fällen sind Antikörper vorhanden, Antigen kann jedoch abwesend sein. Diese Situation hat die Tumorvirologen dazu veranlaßt, nach der Minimalkomponente ihrer Viren in den Tumoren zu suchen. Die Minimalkomponente ist die Nukleinsäure, bei Tumoviren die DNA. Um sie zu suchen, nutzt man die Tatsache, daß einzelsträngige Nukleinsäure rasch Doppelstränge mit anderen Nukleinsäuren bildet, wenn die Sequenz der Nukleotide komplementär ist. Es ist notwendig, daß zumindest 15 aufeinanderfolgende Nukleotide komplementär sind, um stabile Doppelstränge oder Hybride – wie diese benannt werden, wenn sie aus verschiedenen Quellen kommen – zu formen. Wenn sich Hybride gebildet haben, können sie durch kontrolliertes Erhitzen wieder getrennt werden. Der Schmelzpunkt dieser Hybride ist ein wichtiges Merkmal, da er direkt abhängig ist von dem $(G + C)$ Gehalt der DNA im Hybrid, wenn diese ideal gepaart ist. Bei unvollständiger Paarung erniedrigt sich der Schmelzpunkt um ca. 3°C je Prozent unvollständiger Paarung (siehe Formel 1). Diese Gleichung kann verwendet werden, um den Verwandtschaftsgrad bei heterologen Systemen abzuschätzen.

$$T_m = 81,5 + 16,6 \log M + 0,41 (\%G + C) - 820/b - 315 p \quad (\text{Formel 1})$$

T_m : Schmelzpunkt in $^{\circ}\text{C}$; M: Elektrolyt (Na^+); $(G + C)$: Basenzusammensetzung der DNA in %; b: Länge in Nukleotiden; p: unvollständige Paarung (0 p 1) (nach THOMAS und DANCIS, 1973).

Nach dieser kurzen Einleitung soll die Anwendung von Hybridisierungstechniken im Zusammenhang mit Epstein-Barr Virus korrelierten Erkrankungen vorgestellt werden. Frische Biopsien von Burkitts Lymphomen und Nasopharynxkarzinomen und zahlreiche daraus etablierte lymphoblastoide Zelllinien sind auf das Vorhandensein viraler Antigene oder Viruspartikel untersucht worden. In den ersten 10 Jahren, in denen virologische Methoden zur Untersuchung dieser Proben verwendet wurden, waren alle Bemühungen erfolglos. Lediglich einige lymphoblastoide Zelllinien, die Virus produzierten, waren eine Ausnahme. ZUR HAUSEN und Mitarbeiter (ZUR HAUSEN et al., 1970) haben als erste solche Gewebe auf die Anwesenheit viraler DNA mit der Nukleinsäurehybridisierung untersucht. Die angewendete Methode basierte auf der Extraktion von DNA aus den Zellen, gefolgt von einer Spaltung in Einzelstränge, was wir auch als Denaturieren der DNA bezeichnen. Dieser Schritt wird in der Regel durch Erhitzen in Puffern mit sehr niedrigem Salzgehalt und schnelles Abkühlen oder durch kurzzeitige Behandlung mit Alkali erreicht. Die einzelsträngige DNA wurde auf Nitrozellulosefilter gebracht und durch trockenes Erhitzen dort fixiert. Diese Filter mit DNA wurden dann mit radioaktiv markierter einzelsträngiger viraler DNA unter geeigneten Hybridisierungsbedingungen inkubiert und später ausgiebig gewaschen. Hybridisierungsbedingungen sind in der Regel pH kontrollierte Puffer mit bis zu 1 M monovalenten Kationen (meist Na^+) bei $18\text{--}28^{\circ}\text{C}$ unterhalb des Schmelzpunktes der erwarteten Hybride. Abbildung 1 zeigt einige Ergebnisse, die mit einer Abwandlung dieser Methode erhalten wurden. Für diese Studie wurde in Abwandlung der früher verwendeten Markierung der viralen Nukleinsäure durch Kultivierung von virusproduzierenden Zellen in markiertem Wachstumsmedium eine enzymatische Methode gewählt, die es

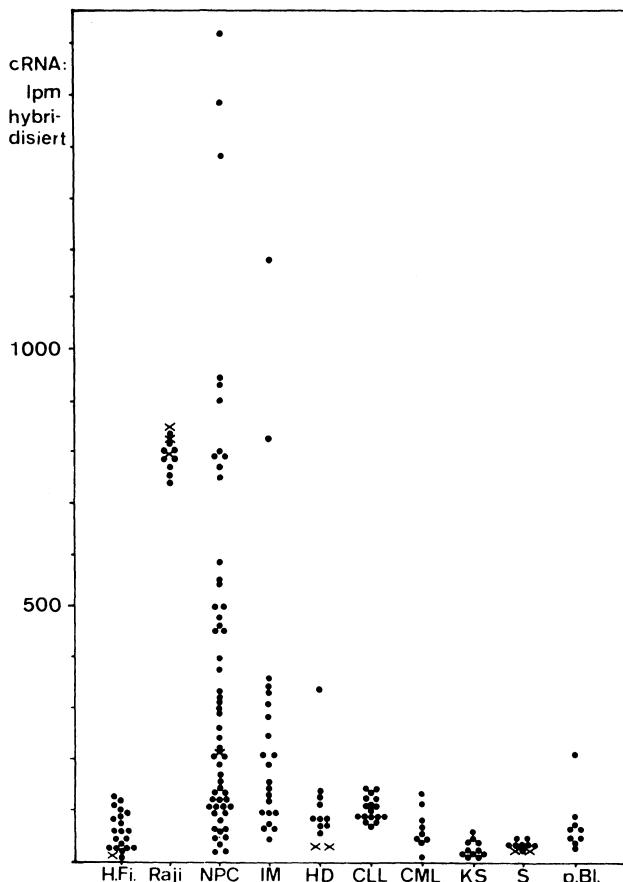


Abb. 1: Filterhybridisierung zum Nachweis von Epstein-Barr-Virus DNA in Geweben verschiedenem Ursprungs (ZUR HAUSEN et al., 1974). 50 µg DNA aus verschiedenen klinischen Materialien und aus Zelllinien als Kontrolle wurden an Filter gebunden und mit 50 000 Ipm EBV spezifischer komplementärer RNA hybridisiert. Die Lage der Punkte ergibt die Menge der gebundenen Radioaktivität. Die als Kontrolle mitgeführte DNA von Raji Zellen enthält ca. 50 virale Genome je Zelle. H.Fi.: menschliche Fibroblasten, Raji: lymphoblastoide Zelllinie, NPC: Nasopharynxkarzinom, IM: infektiöse Mononukleose, HD: Morbus Hodgking, CLL: chronisch lymphatische Leukämie, CML: chronisch myeloische Leukämie, KS: Kaposi-Sarkom, S: Sarcoidose (M. Boeck), p. Bl: peripheres Blut von gesunden Spendern.

erlaubt, wesentlich höhere spezifische Aktivitäten der viralen Nukleinsäure zu erhalten. Damit gelingt es, noch etwa 5 virale Genomäquivalente pro Zelle nachzuweisen (siehe auch WOLF et al., 1975; WOLF et al., 1981).

Da das EBV als strikt lymphotropes Virus galt, stellte sich im Falle des Nasopharynxkarzinomes die Frage, ob die virale DNA in den epithelialen Tumorzellen oder ausschließlich in infiltrierenden Lymphozyten nachzuweisen ist. Durch eine Abwandlung der beschriebenen Hybridisierungstechnik versuchten wir diese Frage direkt zu beantworten. Hierzu wird die virale DNA nicht aus dem Gewebe extrahiert, sondern z. B. bei Gefrierschnitten dort belassen und *in situ* in Einzelstränge gespalten. Dieses «Denaturieren» kann durch kurzes Kochen in wässrigen Puffern oder durch Alkalibehandlung geschehen. Mit den vorbehandelten Schnitten kann direkt eine Hybridisierungsreaktion durchgeführt werden. Der Nachweis der Bindung für das Vorhandensein viraler DNA in den Zellen kann dann zweckmäßig durch Autoradiographie erfolgen (Abb. 2, WOLF et al., 1973).

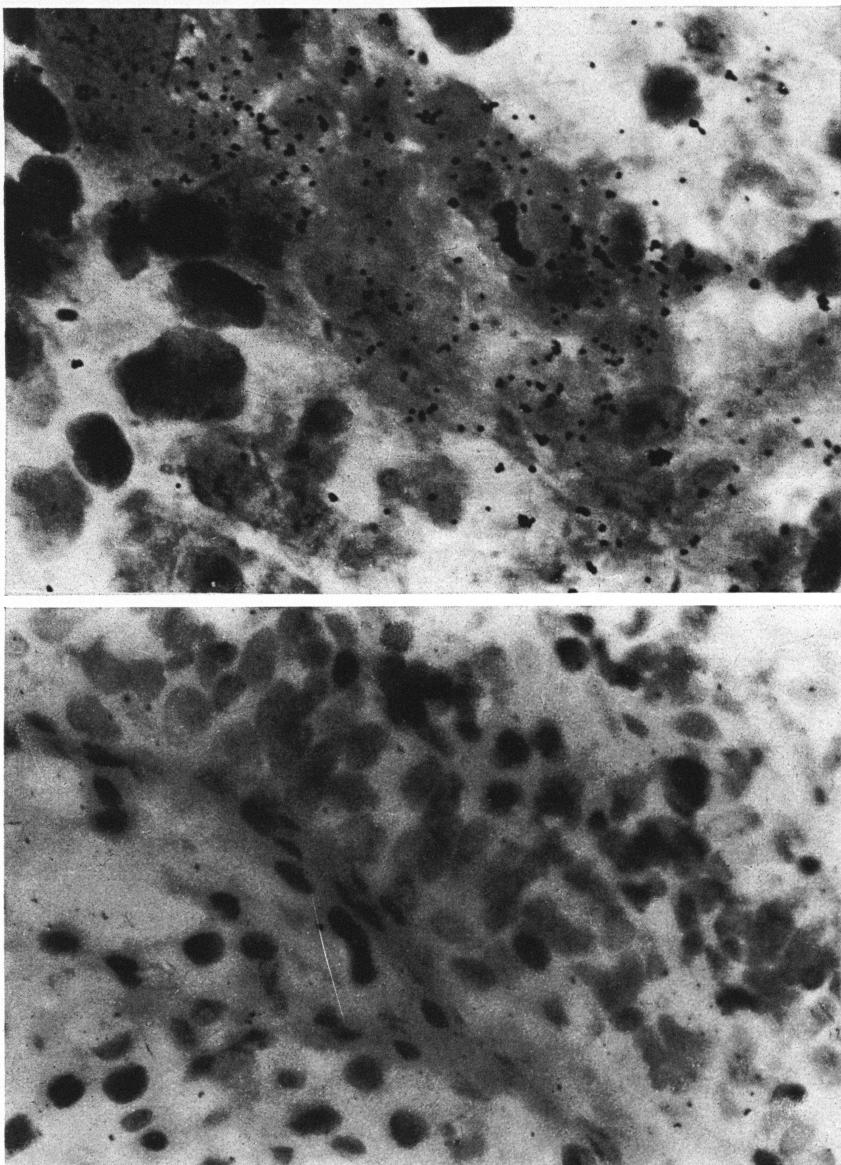


Abb. 2: *In situ* Hybridisierung zum Nachweis von EBV DNA in den epithelialen Zellen des Lymphoepitheliomes. Ein Gefrierschnitt eines Nasopharynxkarzinoms wurde mit 50 000 Ip μ m EBV spezifischer komplementärer RNA hybridisiert, nachdem er 2 min mit 0,07 N NaOH behandelt, neutralisiert und getrocknet worden war. Anschließend wurde der Objektträger in Ilford G5 Photoemulsion getautcht, getrocknet und 3 Wochen bei 4 °C exponiert. Nach dem Entwickeln wurde mit Giemsa gefärbt. Das untere Bild zeigt einen Schnitt, der direkt mit Giemsa gefärbt worden war (Einzelheiten siehe WOLF et al., 1973).

Die gleiche Aussage, daß EBV DNA tatsächlich in den epithelialen Tumorzellen des Nasopharynxkarzinomes vorhanden ist, konnte mit einer unabhängigen Methode bestätigt werden. Hierzu wurden Zelltypen aus mechanisch zerkleinerten Biopsien über Dichtegradienten getrennt und die extrahierte DNA der einzelnen Zellfraktionen mit der Filtertechnik hybridisiert (DESGRANGES et al., 1975).

Obwohl EBV DNA regelmäßig in allen histologisch einwandfreien Biopsien des Nasopharynxkarzinomes nachgewiesen werden konnten (WOLF et al., 1975), kann dies nicht ohne weiteres als ein Nachweis einer onkogenen Wirkung des EBV gelten. Andererseits ist es unmöglich, die Koch-Henleschen Postulate für ein mögliches Tumorvirus des Menschen zu erfüllen.

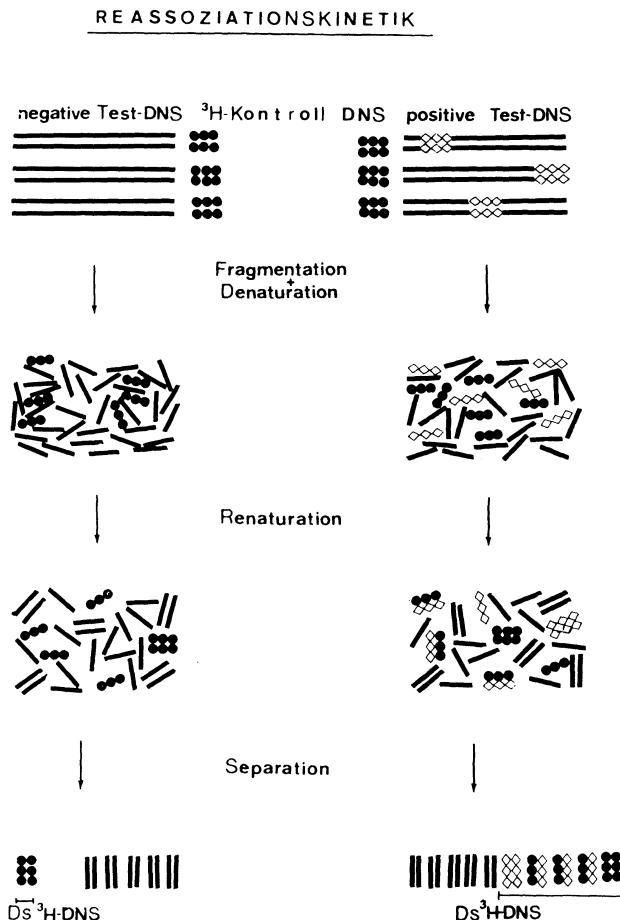


Abb. 3 A: Schema einer Reassoziationskinetik. DNA aus Kontrollen oder Tumormaterialien mit viralen Sequenzen (durch Rauten dargestellt) wird in kurze einzelsträngige Fragmente gespalten. Radioaktive virale DNA (durch Punkte dargestellt) wird im gleichen Ansatz mitbehandelt. Unter geeigneten Salz- und Temperaturbedingungen, ca. 25° unterhalb des Schmelzpunktes der DNA wird die DNA-Mischung dann inkubiert. Zu bestimmten Zeiten werden Proben entnommen und daraus die gebildeten Doppelstränge abgetrennt. Wenn die Tumor-DNA virale Sequenzen enthält, ist die Bildung von doppelsträngiger DNA mit einem Gehalt von mindestens einem radioaktiv markierten Partner entsprechend beschleunigt. Die so erhaltenen Ergebnisse zu verschiedenen Zeitpunkten werden häufig in einer linearisierten Darstellung graphisch aufgetragen. Der Tangens der erhaltenen Geraden ist ein Maß für die Geschwindigkeit der Bildung der Doppelstränge. Durch einen Vergleich mit eingemessenen Werten kann eine unbekannte Probe bestimmt werden. Auf den Achsen der linearisierten Darstellung sind abgetragen: Auf der Ordinate der Quotient aus der Gesamtmenge radioaktiver DNA und dem zum Zeitpunkt der Messung noch als Einzelstrang vorliegenden Teil. Auf der Abszisse das Produkt aus der bis zur Probeentnahme abgelaufenen Zeit in Std., der Gesamtkonzentration der DNA in ges. Molarität von Nukleotiden/l. Da die Konzentration für ein Experiment häufig gleich bleibt, wird auf der Abszisse vereinfacht oft nur die abgelaufene Zeit abgetragen. Die Auftrennung der Doppelstränge erfolgt entweder durch Chromatographie über Hydroxylapatit (BERNARDI, 1965) oder durch Verwendung von einzelstrangspezifischen Nukleaseen und anschließende Fällung mit Säure (SUTTON, 1971).

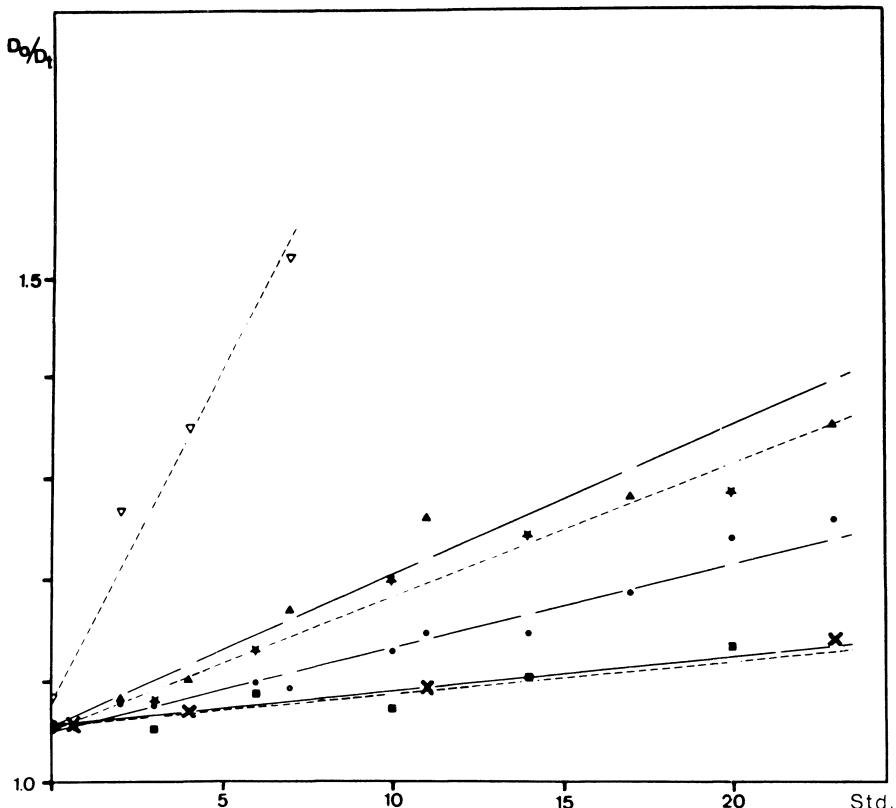


Abb. 3 B: Nachweis von EBV DNA in Autopsiematerialien eines mit EBV inkulierten Krallenaffen mit Hilfe der Reassoziationskinetik. *In vitro* H^3 markierte DNA aus EBV Virionen wurde zum Hybridisieren verwendet, nähere Angaben siehe WOLF et al., 1973, 1975. Im Vergleich mit einer künstlichen Mischung von Kalbsthymus DNA mit viraler DNA ergibt sich ein Gehalt von ca. 1 Virusgenom je Zelle aus dem Tumorgewebe und von 0,4 viralen Genomen je Zelle aus der Milz. Alle anderen Gewebeproben des Tieres waren negativ. Die DNA Konzentration war in jedem Fall 2 mg/ml, falls notwendig, wurde mit Kalbsthymus DNA ergänzt. Die Testansätze enthielten: --- ∇ 200 μ g/ml Raji Zell DNA (Rajizellen enthalten 50 Genome EBV DNA pro Zelle); ---★ 40 mg/ml EBV DNA; ---■ 2 mg/ml Kalbsthymus DNA; —× 2mg/ml DNA von Lymphknoten des Krallenaffen; —● 2 mg/ml DNA aus der Milz; —▲ 2 mg/ml DNA aus dem Tumor.

Mehreren Gruppen (SHOPE et al., 1973; WOLF et al., 1973; FALK et al., 1976) ist es gelungen, durch Inkulation von EBV-Präparaten in Krallenaffen Tumore zu erzeugen. Wir verwendeten hierzu Virus, das aus der lymphoblastoiden Zelllinie eines Patienten mit infektiöser Mononukleose gewonnen wurde (WERNER et al., 1975). Um einen vollständigen Nachweis zu führen, mußte versucht werden, in den Tumorautopsien EBV DNA mit der bereits vorgestellten Filterhybridisierung nachzuweisen. Mit der verwendeten radioaktiven viralen Nukleinsäure waren alle Proben negativ. Dieser Befund macht auf ein generelles Problem aufmerksam, auf die Auflösung eines Testes. Es zeigte sich nämlich, daß eine andere Testmethode, die Methode der Reassoziationskinetik positive Ergebnisse lieferte (Abb. 3 a, b).

Von großer Bedeutung für die erreichbare Auflösung dieses Testsystems ist in erster Linie die spezifische Radioaktivität der tracer DNA (FRENKEL et al., 1976), die im vorliegenden Fall bei 2×10^6 Zerfällen pro min je μ g DNA lag. Es ist einleuchtend, daß eine höhere spezifische Aktivität zu einer höheren Sensibilität des Testes führt. Aus der gezeigten Graphik ist dieser Bezug klar abzuleiten, da bei Verwendung von

hoch-radioaktiv markierter DNA die Zahl der einzusetzenden Moleküle von markierter Virus-DNA geringer sein kann, ohne die Meßgenauigkeit, die abhängig ist von der eingesetzten Radioaktivität, zu beeinträchtigen. Weniger Moleküle von Virus-DNA werden auch seltener mit sich selbst Doppelstränge bilden und eine Beschleunigung auch durch wenige im Untersuchungsmaterial vorhandene homologe Sequenzen entdeckbar machen. Bei zunehmendem Bedarf an empfindlichen Nachweismethoden müssen wir vor allem nach Möglichkeiten suchen, Test DNA möglichst hochspezifisch zu markieren. Für die soeben geschilderte Reassoziationskinetik wurde die Test DNA durch vorsichtige Behandlung mit pankreatischer DNase mit Einzelstrangbrüchen versehen, die dann als Ausgangspunkt für DNA Polymerase diente. DNA Polymerase, das Kornberg Enzym, entfernt sukzessive Nukleotide vom 5' Ende und fügt unter bestimmten Temperaturbedingungen dem freien 3' Ende (mit OH Gruppen) neue zum Parallelstrang komplementäre und in unserem Fall radioaktiv markierte Nukleotide hinzu.

Mit dieser Methode, die von mehreren Firmen bereits als Baukastensystem angeboten wird (NEN, Amersham-Buchler), lassen sich bei Verwendung von P^{32} -Nukleosid-triphosphaten spezifische Aktivitäten bis zu 2×10^9 Zerfällen pro min. und μg erreichen (RIGBY et al., 1977). Wegen der notwendigen Reinheit der tracer DNA wird zunehmend in Plasmiden oder Phagenvektoren klonierte DNA zum Markieren verwendet.

Eine vor allem bei kleinen Viren mit großem Erfolg verwendete Hybridisierungsmethode ist durchaus mit entsprechenden Modifikationen auch für größere Viren einsetzbar. Ausgangspunkt dieser Methode ist die Verwendung von gereinigter DNA, die mit einem bestimmten Restriktionsenzym behandelt wird, das im Idealfall knapp innerhalb der gesuchten Sequenz schneidet. Das Gemisch aller Fragmente wird geelektrophoretisch nach Größe getrennt, nach Denaturieren durch Absaugen nach der Methode von (SOUTHERN, 1980) auf Nitrozellulosefilter transferiert und mit einer entsprechend hochmarkierten tracer-DNA hybridisiert. Nach Autoradiographie zeigt die Schwärzung einer Bande ein positives Ergebnis (BOTCHAN et al., 1976). Der Vorteil der Methode liegt darin, daß die interessanten Sequenzen einer zu testenden DNA auf eine kleine Region konzentriert werden und so ein recht empfindliches und deutliches Signal liefern können (Abb. 4).

Um hohe Verarbeitungsgeschwindigkeiten für Serienuntersuchungen bei höchster Auflösung zu erreichen, haben wir (R. SEIBL, W. RICHTER, Y. ZENG, H. WOLF, Manuskript in Vorbereitung) ein System entwickelt, das dazu verwendet werden soll, im Falle des Nasopharynxkarzinoms und eventuell anderer Erkrankungen Zellproben zu sammeln und möglichst schnell untersuchen zu können. Wir verwenden hierzu ein Gerät,

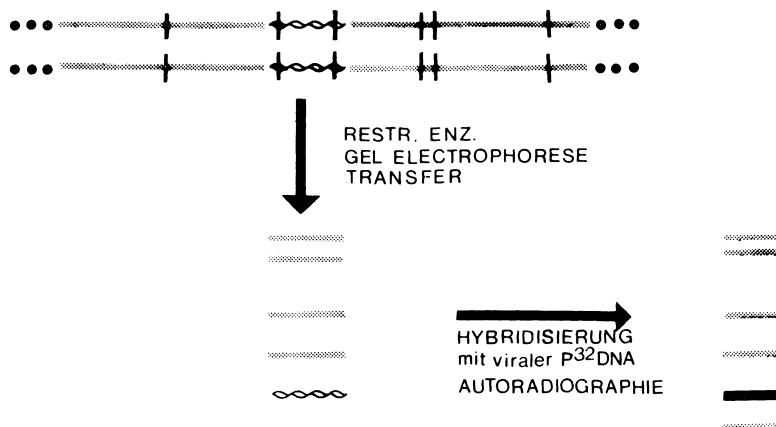


Abb. 4: Schematische Darstellung des Arbeitsganges beim Nachweis viraler Sequenzen in Zell DNA nach Behandlung mit Restriktionsenzymen. Die Erklärung der Vorgänge erfolgt im Text.

das über eine doppelröhrlige Sonde Pufferlösung an den Ort der Tumorlokation spült und unter Mitnahme von Zellen wieder absaugt. Die Zellen werden über Blenden auf Nitrozellulosefilter in kleinen Kolonien gesammelt. Nach dem Trocknen können die Zellen direkt auf dem Filter lysiert, die DNA in Einzelstränge gespalten und gebunden werden. Nach diesem Vorgang erfolgt dann die Hybridisierung mit P^{32} markierter viraler tracer DNA und Autoradiographie. In Rekonstruktionsexperimenten konnten wir im Idealfall 10 virusproduzierende Zellen nachweisen, was einer Menge von 20 pg viraler DNA entspricht (Abb. 5). Diese Methode wird gerade für die Untersuchung von Patienten mit Nasopharynxkarzinom eingeführt.

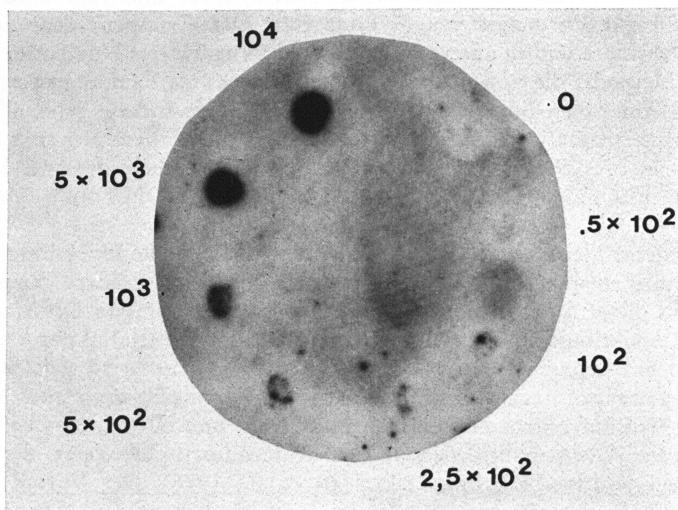


Abb. 5: Vereinfachte Hybridisierung zum Nachweis von EBV DNA in Zellaspiraten. Die Hybridisierungsreaktion wurde mit P^{32} markierter ($2 \times 10^9 \text{ Ipm}/\mu\text{g}$), in Charon-Phagen klonierter EBV DNA durchgeführt (GRUNSTEIN und HOGNESS, 1975). Das Bild zeigt die Ergebnisse eines Rekonstitutionsexperiments mit insgesamt 10^4 Zellen je Punkt. Die im Bild angegebene Zahl von P3HR1 Zellen (5 % davon virusproduzierend) wurden durch EBV-negative Zellen auf 10^4 ergänzt.

Trotz der immer empfindlicheren Methoden kommt es vor, daß eng verwandte Viren nicht kreuzreagieren und deshalb entgegen der meist erfolgreichen Kreuzhybridisierungsteste nicht gegenseitig als Test DNA verwendet werden können. Solche Beobachtungen wurden von KASCHKA-DIERICH für das Herpesvirus der Marekschen Geflügel-lähme bei Hühnern und das serologisch eng verwandte und als Vakzine dienende Trut-hahnherpesvirus (KASCHKA-DIERICH et al., 1979) gemacht.

Negative Hybridisierungsergebnisse sind also auch bei empfindlichen Methoden kein Nachweis für die Abwesenheit eines möglicherweise recht nahe verwandten Erregers. Der Grund für diese Diskrepanz ist in der Redundanz des genetischen Kodes zu sehen.

Vor allem im Falle der *in situ* Hybridisierung sind andererseits wiederholt marginale Ergebnisse überinterpretiert oder sogar falsch positive Ergebnisse beschrieben worden. Um die höhere Auflösung bei *in situ* Hybridisierungen zu erreichen, ist es möglich, den vervielfachenden Effekt der Transkription von aktiven viralen Genen zu nutzen. Durch diese Technik konnte in Biopsien von Cervixkarzinomen Regionen gefunden werden, in denen die virusspezifische markierte tracer DNA deutlich stärker gebunden wurde (McDOUGALL et al., 1980). Da in solchen Schnitten Artefakte durch DNA-bindende Proteine oder auch lokale Austrocknungseffekte kaum völlig ausgeschlossen werden können, ist es unablässig, mit einer unabhängigen Technik, z. B. der Hybridisierung,

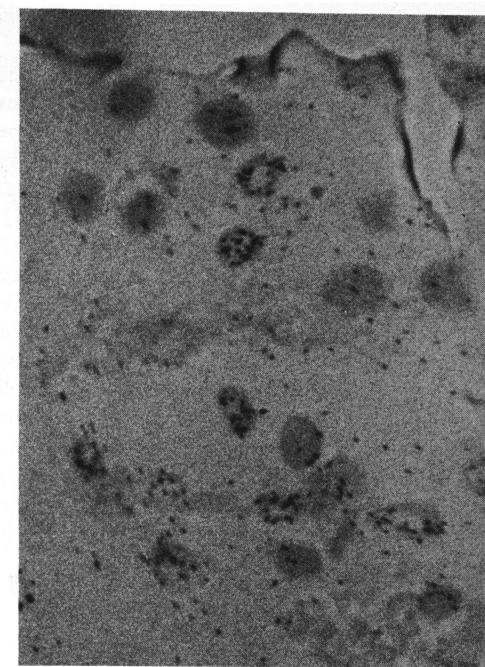


Abb. 6 A: *In situ* Hybridisierung mit einem Gefrierschnitt einer Parotis mit H^3 EBV DNA (WILMES und WOLF, 1981; WOLF et al., im Druck). Die verwendete Technik war die gleiche wie in Abb. 2 beschrieben mit dem Unterschied, daß Fragmente von EBV DNA aus Plasmiden von *E. coli* verwendet wurden. Die EBV DNA Fragmente waren durch Rekombination in die Plasmide integriert und als solche in *E. coli* vermehrt worden (SKARE and STROMINGER, 1980). Die so gewonnene virale DNA ist völlig frei von geringsten Verunreinigungen mit Zell DNA und ergibt auch bei höchster enzymatischer Markierung keine unspezifischen Ergebnisse.

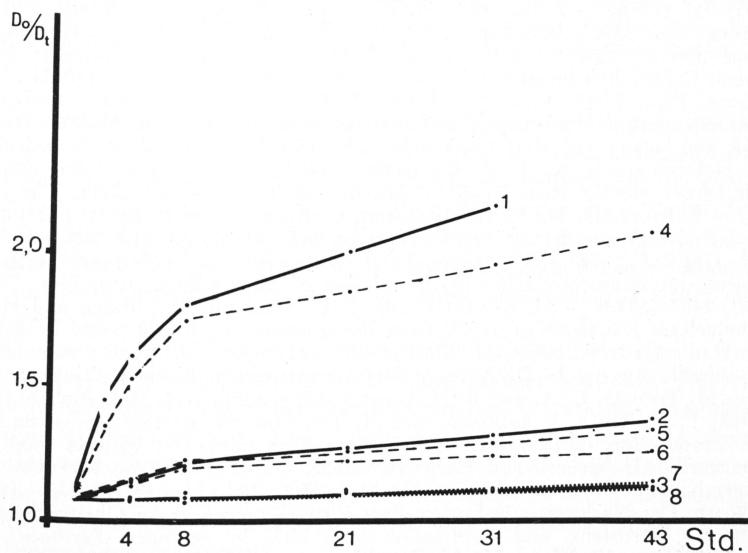


Abb. 6 B: Reassoziationskinetik zum Nachweis von EBV DNA in 3 Parotiden und 6 Tonsillen. Die Ansätze 1, 2, 3 sind Kontrollen mit 2 mg/ml DNA, sie enthält neben Kalbsthymus DNA 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Nr. 1), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Nr. 2) oder keine (Nr. 3) DNA aus Rajizellen, welche je Zelle 50 EBV Genome enthalten. Während alle 3 Parotisgewebe EBV Sequenzen enthalten (Ansatz 4, 5, 6) war in den untersuchten Geweben von Tonsillen (7, 8, insgesamt 6 untersucht) keine EBV DNA nachweisbar (WILMES und WOLF, 1981).

an Restriktionsfragmente an Nitrozellulosefiltern (siehe Abb. 4) oder der Reassoziationskinetik, diese Ergebnisse zu bestätigen.

Unter Verwendung dieser Vorsichtsmaßnahmen haben wir kürzlich gefunden, daß das lymphotrope Epstein-Barr-Virus außer in peripheren Lymphozyten in der Parotis persistiert und sehr wahrscheinlich dort produziert und in den Speichel entlassen wird (Abb. 6 A). Aus dem Speichel wird das EBV dann weiter übertragen. Die Bestätigung der Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung erfolgt in diesem Fall durch Reassoziationskinetik (Abb. 6 B) (WILMES und WOLF, 1981; WOLF et al., im Druck).

Die ausgewählten Beispiele haben zwei Hauptrichtungen der Entwicklung in der Nukleinsäurehybridisierungstechnik aufgezeigt. Zum einen den Trend zur möglichst einfach zu handhabenden höchst empfindlichen Nachweismethode viraler Nukleinsäure. Dabei ist zu beachten, daß bereits bei serologisch relativ nah verwandten Viren die Nukleinsäurehybridisierung in seltenen Fällen schwach sein kann, obwohl die serologische Verwandtschaft recht eng sein kann. Andererseits habe ich die für bestimmte Fragen der Latenz besonders potente Methode der *in situ* Hybridisierung erläutert.

Vorteile dieser Methode sind die Möglichkeit einer Zuordnung des Gehaltes viraler Nukleinsäuren auf bestimmte Gewebe und der Nachweis vereinzelt positiver Zellen in einem großen Überschuß von Normalzellen. Wegen der Gefahr von Unspezifitäten sollten mit dieser Methode erhältene Ergebnisse jedoch durch unabhängige Untersuchungen bestätigt werden.

Literatur

1. BERNARDI, G.: Chromatography of nucleic acid on hydroxyapatite. *Nature* **206**, 776 (1965).
- 2. BOTCHAN, M., W. C. TOPP, and J. SAMBROOK: The arrangement of simian virus 40 sequences in the DNA of transformed cell. *Cell* **9**, 269 (1976). – 3. DEGRANGES, C., H. WOLF, G. DE THÉ, K. SHANMUGARATNAM, N. CAMMOUN, R. ELLOUZ, G. KLEIN, K. LENNERT, N. MUÑOZ, and H. ZUR HAUSEN: Nasopharyngeal carcinoma. X. Presence of Epstein-Barr genomes in separated epithelial cells of tumors in patients from Singapore, Tunisia and Kenya. *Int. J. Cancer* **16**, 7 (1975). – 4. FALK, L., F. DEINHARDT, L. WOLF, D. JOHNSON, J. HILGERS, and G. DE THÉ: Epstein-Barr virus: Experimental infection of *Callithrix jacchus* marmosets. *Int. J. Cancer* **17**, 785 (1976). – 5. FRENKEL, N., H. LOCKER, B. COX, B. ROIZMAN, and F. RAPP: Herpes simplex virus DNA in transformed cells: Sequence complexity in five hamster cell lines and one derived hamster tumor. *J. Virol.* **18**, 885 (1976). – 6. GRUNDSTEIN, M. and D. S. HOGNESS: Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 3961 (1975). – 7. KASCHKA-DIERICH, C., G. W. BORNKAMM, and R. THOMSSEN: No homology detectable between Marek's Disease virus (MDV) DNA and herpesvirus of the turkey (HVT) DNA. *Med. Microbiol. Immunol.* **165**, 223 (1979). – 8. McDougall, J. K., D. A. GALLOWAY, and C. M. FENOGLIO: Cervical carcinoma: Detection of herpes simplex virus RNA in cells undergoing neoplastic change. *Int. J. Cancer* **25**, 1 (1980). – 9. RIGBY, D. W. J., M. DIECKMAN, C. RHODES, and P. BERG: Labeling desoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* **113**, 237 (1977). – 10. SHOPE, T., D. DECHARIO, and G. MILLER: Malignant lymphoma in cotton-top marmosets following inoculation of Epstein-Barr virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 2487 (1973). – 11. SKARE, J. and J. L. STROMINGER: Cloning and mapping of *Bam*H I endonuclease fragments of DNA from the transforming B95-8 strain of Epstein-Barr virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 3860 (1980). – 12. SUTTON, W. D.: A crude nuclease preparation suitable for use in DNA reassociation experiments. *Biochem. Biophys. Acta* **240**, 522 (1971). – 13. THOMAS, C. A. and B. M. DANCIS: Ring stability. *J. Mol. Biol.* **77**, 43 (1973). – 14. WERNER, J., H. WOLF, J. APODACA, and H. ZUR HAUSEN: Further studies on the detection of the Epstein-Barr virus DNA in nasopharyngeal carcinoma biopsies from different parts of the world. *Oncogenesis and Herpesviruses II*, 191 (1975). – 15. WETMUR, J. G. and N. DAVIDSON: Kinetics of renaturation of DNA. *J. Mol. Biol.* **31**, 349 (1968). – 16. WILMES, E. und H. WOLF: Der Nachweis von Epstein-Barr-Virus-Genomen in der Ohrspeicheldrüse (Untersuchungen zur Persistenz und Replikation von EBV in gesunden Personen). *Laryng.-Rhinol.* **60**, 7 (1981). – 17. WOLF, H., H. ZUR HAUSEN, and V. BECKER: EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. *Nature New Biology* **138**, 245 (1973). – 18. WOLF, H., H. ZUR HAUSEN, G. KLEIN, V. BECKER, G. HENLE, and W. HENLE: Attempts to detect virus-specific DNA sequences in human tumors. III. Epstein-Barr viral DNA in non-lymphoid nasopharyngeal carcinoma cells. *Med. Microbiol. Immunol.* **161**, 15 (1975). – 19. WOLF, H., J. WERNER, and H. ZUR HAUSEN: EBV DNA in non-lymphoid cells of nasopharyngeal carcinomas and in a malignant lymphoma obtained after inoculation of EBV into cotton-top

marmosets. Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology XXXIX, Cold Spring Harbor Laboratory 791 (1975). – 20. WOLF, H., G. J. BAYLISS, and E. WILMES: Biological properties of Epstein-Barr virus. Cancer Campaign, E. GRUNDMAN (Ed.), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York (im Druck). – 21. ZUR HAUSEN, H., H. SCHULTE-HOLTHAUSEN, G. KLEIN, W. HENLE, G. HENLE, P. CLIFFORD, and L. SANTESSON: EBV DNA in biopsies of Burkitt tumors and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. Nature 228, 1056 (1970). – 22. ZUR HAUSEN, H., H. SCHULTE-HOLTHAUSEN, H. WOLF, K. DÖRRIES, and H. EGGER: Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. II. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human herpes group viruses. Int. J. Cancer 13, 657 (1974). SOUTHERN, E. M.: Gel electrophoresis of Restriktion Fragments in «Methods in Enzymologie», Ray Wu ed Vol 68 pp 152–176 Academic Press New York 1980.

Moderator: H. COTTIER, Bern

Virus und Leber — Pathogenese der Virushepatitis

Virus and the Liver — Pathogenesis of Viral Hepatitis

(Referat · report)

F. DEINHARDT

Max von Pettenkofer-Institut der Universität München

Mit 2 Abbildungen und 4 Tabellen

Summary

The nature of the three forms of human viral hepatitis, hepatitis A, hepatitis B and hepatitis non-A, non-B is described. The biochemical and immunological characteristics of the viruses causing hepatitis A and B, and the diagnostic tests based on them, have made it possible to define the pathogenesis of the three viral hepatides in considerable detail. Immune prophylaxis using immune serum globulin and a vaccine for hepatitis B, alone and in combination, is described.

Wir unterscheiden heute drei Formen der akuten, primären Virushepatitis. Hepatitis A entspricht der epidemischen infektiösen Hepatitis und sie wird auch als kurze Inkubationszeit-Hepatitis bezeichnet. Von ihr trennen wir die Hepatitis B, die in der Vergangenheit auch als homologer Serumikterus, Posttransfusions- bzw. lange Inkubationszeit-Hepatitis identifiziert wurde. Schließlich können wir durch Ausschluß dieser beiden Hepatitisformen die Nicht-A, Nicht-B Hepatitis diagnostizieren. Man sollte diese Hepatitis nicht Hepatitis C nennen, weil sich unter diesem Begriff sicher mehr als ein kausales Agens verbirgt.

Daneben treten Hepatiden als Begleiterkrankungen bei einer Reihe von anderen mikrobiellen Infektionen auf, wie z. B. bei den haemorrhagischen Fiebern, bei der durch das Epstein-Barr-Virus (EBV) hervorgerufenen infektiösen Mononukleose, der Cytomegalie, Mumps und einer Reihe anderer Viruserkrankungen. In dieser Gruppe sind klinisch vor allem die haemorrhagischen Fieber, die EBV-Infektionen und die Cytomegalie von Bedeutung. Die offizielle Nomenklatur der Weltgesundheitsorganisation, die Einteilung der primären Hepatitiden und die Eigenschaften der Erreger sind in den Tabellen 1–3 wiedergegeben.

Hepatitis A

Die Hepatitis A wird faekal-oral übertragen; sie ist meist eine milde Erkrankung, doch treten auch schwere und selbst fulminante Verlaufsformen auf. Die akute Er-