

Der Nachweis von Epstein-Barr-Virus-Genomen in der Ohrspeicheldrüse

(Untersuchungen zur Persistenz und Replikation von EBV in gesunden Personen)

E. Wilmes, H. Wolf

Aus der Universitäts-HNO-Klinik (Direktor: Prof. Dr. med. H. H. Naumann) und dem Max-von-Pettenkofer-Institut (Direktor: Prof. Dr. F. Deinhardt) der Universität München

Einleitung

Das lymphotrope Epstein-Barr Virus (EBV) gilt als Erreger der infektiösen Mononukleose (Pfeiffersches Drüsenfieber). Für die EBV-Ätiologie spricht der morphologische Nachweis derartiger Viren in Lymphozyten von Mononukleosekranken und die regelmäßig auftretenden, lange persistierenden Antikörper. Die Erkrankung wird als Tröpfcheninfektion oder durch direkten Mund zu Mund Kontakt übertragen. Zu den Symptomen gehört eine am Hals lokalisierte oder generalisiert auftretende Lymphadenopathie. Neben Lymphknoten sind Milz, Tonsillen und das gesamte lymphatische Gewebe beteiligt. Die Mononukleose hinterläßt eine lebenslange Immunität.

Das Virus kann regelmäßig im Speichel von erkrankten Patienten nachgewiesen werden (2). Auch seropositive gesunde Patienten scheiden EB-Viren mit dem Speichel aus (3).

Als Ort der Virusproduktion kommen die B-Lymphozyten des Oropharynx – möglicherweise aus dem Waldeyerschen Rachenring – in Frage, da nur B-Lymphozyten als die natürlichen Zielzellen von EBV gelten (4, 6).

Erst kürzlich wurden in den Ausführungsgängen der großen Ohrspeicheldrüsen Viren in hoher Anzahl gefunden (5). Dies führte zu der Vermutung, daß die Viren aus den Speicheldrüsen stammen könnten.

Zur Frage der Viruspersistenz und Produktion untersuchten wir daher lymphozytenreiche Gewebe aus dem Oropharynx (tonsilla palatina) sowie die Ohrspeicheldrüsen.

Material und Methodik

Von seropositiven Personen wurden 6 Gaumentonsillen und drei Ohrspeicheldrüsen untersucht. Die Tonsillen stammten von Patienten, die wegen einer chronischen Tonsillitis operiert wurden. Das Parotisgewebe stammte von Patienten, die wegen anderer Erkrankungen im HNO-Bereich operiert wurden. Die Speicheldrüsen waren klinisch und morphologisch unauffällig.

Prinzip der Nukleinsäurehybridisierungen

Zum Nachweis viraler DNA von Epstein-Barr Virus wurden Nukleinsäurehybridisierungen in Gewebeproben angewandt. Hierzu wird die DNA der Gewebe entweder nach vorheriger Extraktion (Reassoziationskinetik) oder direkt in Gefrierschnitten durch Hitze oder Alkalibehandlung in Einzelstränge zerlegt (in situ Hybridisierungen). Diese Präparationen werden dann mit einer geringen Menge hoch radioakti-

Zusammenfassung

Das lymphotrope Epstein-Barr Virus gilt als Erreger der infektiösen Mononukleose. Nach einer Infektion lassen sich lebenslang spezifische Antikörper im Serum nachweisen, und das Virus selbst läßt sich noch Monate bis Jahre danach aus dem Speichel isolieren.

Die natürlichen Zielzellen für EBV sind B-Lymphozyten. Es ist jedoch unklar, ob spontane Aktivierungen von EBV-Genomen in genomtragenden Lymphozyten, wie sie in lymphozytenreichen Organen des Oropharynx vorkommen, für die lebenslange Persistenz von Antikörpern gegen EBV-spezifische Antigene und das Freisetzen von Virus in den Oropharynx verantwortlich sind. Alternativ könnte sich EBV zusätzlich in spezifischen Regionen des Körpers befinden und dort auch produziert werden. Dies würde in etwa der Situation der Marekschen Erkrankung von Hühnern entsprechen. Der Erreger dieser Erkrankung – ebenfalls ein Herpesvirus – befällt T-Lymphozyten, wird aber in den Keimepithelien der Federfollikel produziert und von dort verbreitet.

In-situ-Hybridisierungen an Gefrierschnitten von Tonsillen und Ohrspeicheldrüsen zeigen, daß sich EBV-Genome im Gewebe der Ohrspeicheldrüse von gesunden seropositiven Personen befinden. Die Daten der In-situ-Hybridisierungen konnten durch Reassoziationskinetiken mit extrahierter DNA aus den untersuchten Geweben bestätigt werden.

Wir nehmen an, daß die spontane Aktivierung von EBV in peripheren Lymphozyten ein sehr seltenes Ereignis ist und weder die Quelle für EBV im Speichel noch den Grund für die lebenslange Persistenz von Antikörpern gegen EBV-spezifische Antigene darstellt.

Evidence for the Persistence of Epstein-Barr-Virus in the Parotid Gland

EBV is associated with B-lymphocytes. It is, however, not clear whether spontaneous activation of EBV genomes in carrier lymphocytes, which are present in the lymphocyte rich area of the oropharynx, is responsible for lifelong persistence of antibody-titers directed against EBV related antigens and the shedding of virus into the oropharynx. Alternatively EBV could reside in specific sites of the body and be produced there resembling somehow the situation of Marek's disease virus of chicken.

That virus is found in T-lymphocytes and produced and spread from the epithelium of featherfollicles.

In situ hybridisations with frozen sections of tonsils and parotid glands revealed that EBV genomes are present in the tissue of the parotid gland of healthy seropositive persons. The data from *in situ* hybridisations could be confirmed using stringent reassociation kinetics.

It is suggested that spontaneous activation of the lymphocytes is a very rare event and neither the source of virus in the saliva nor the reason for the lifelong persistence of antibodies to EBV related antigens.

ver Virus-DNA inkubiert. Die zugegebene Virus-DNA wird nur an die DNA der Präparate gebunden, wenn diese entsprechende Sequenzen viraler DNA enthalten (Hybridisierung). Der Nachweis der Bindung erfolgt entweder durch Messung der gebundenen Radioaktivität im Zählergerät oder autoradiographisch durch Beschichtung der Schnitte mit Fotoemulsion.

Zur Absicherung der Ergebnisse wurde noch eine zweite unabhängige Methode angewandt. Hierbei wird die zu untersuchende DNA vollständig gereinigt und unter Bedingungen mit der radioaktiven viralen DNA gemischt, die ausschließlich hoch spezifische Bindungen von längeren homologen DNA-Abschnitten erlauben. Die Kinetik der Bindung der viralen DNA und die zu untersuchende DNA im Vergleich zu positiven und negativen Kontrollen (Kalbsthymus-DNA) wird ausgewertet.

Als Kontrolle wurde eine Zellkultur, die aus einem Burkitt-Lymphom etabliert worden war, verwendet (P 3 HR-1). 5–10 % der Zellen dieser Zelllinie produzieren Epstein-Barr Virus. Eine weitere Zelllinie (Raji), die ebenfalls einem Burkitt-Lymphom entstammt, wurde als Kontrolle bei der Reassoziationskinetik verwendet. Diese Zelllinie enthält etwa 50 EBV-Genome pro Zelle. Als Negativkontrolle diente DNA aus Kälberthymus.

Durchführung der in-situ-Hybridisierung

Zur in-situ-Hybridisierung (modifiziert nach Wolf et al. (7, 8)) wurden 8 µm dicke Gefrierschnitte 2 min in drei Teilen Methanol, einem Teil Eisessig fixiert, 30 min bei 70 °C in 2 x SSC (1 x SSC = 0,15 M NaCl, 0,015 M Na-Zitrat) inkubiert und 15 min bei 37 °C mit 1 µg/ml Proteinase-K behandelt. Direkt vor der Hybridisierung wurden die Präparate 3 sec bei 98 °C in 0,1 x SSC denaturiert, in dem gleichen Puffer bei 0 °C abgeschreckt und luftgetrocknet.

10 µl Hybridisierungslösung (mit 100 000 Ipm radioaktiver EBV-DNA, spezifisch aktiviert ca. 5×10^6 Ipm/µg; in 50 % Formamid 0,6 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 100 µg/ml Kalbsthymus DNA, 1 mg/ml Rinderserumalbumin, 1 mg/ml t-RNA, 100 µg/ml Poly A, 0,02 % wt/vol Polyvinylpyrrolidon, 0,02 % wt/vol Ficoll) wurden unter einem silikonisierten Deckglas über den Schnitten mit Klebstoff eingeschlossen. Die Hybridisierung wurde über 4 Std. bei 4 °C durchgeführt. Anschließend wurden die Deckgläser entfernt und die Schnitte mit fünffachem Wechsel von Formamidpuffer (wie Hybridisierungslösung, aber ohne Polyanionen) für 15 Std. gewaschen, mit 2 x SSC gespült und luftgetrocknet.

Diese Präparate wurden dann in Kodak-NTB-Emulsion (1:1 mit 6 mM Ammoniumazetat verdünnt, 40 °C) getaucht, getrocknet und ca. 3 Wochen bei 4 °C exponiert. Nach dem Entwickeln mit Kodak-D-19-Röntgenfilmentwickler wurden die Präparate mit Giemsa gefärbt.

Durchführung der Reassoziationskinetik

Zur Reassoziationskinetik wurde die zu untersuchende DNA in einer Endkonzentration von 2 mg/ml mit 60 000 Ipm EBV-DNA (5×10^6 Ipg/µg) eingesetzt. Die Denaturierung erfolgte zusammen mit der radioaktiven EBV-DNA durch Alkali-Behandlung (0,27 n NaOH, 10 min 100 °C) und anschließende Neutralisation mit HCl. Die Endkonzentration der Salze des Reassoziationsansatzes war: 0,5 M NaCl, 0,2 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0,05 % Sarkosyl, pH 8,0. Die Reassoziations temperatur betrug 68 °C. Die Trennung der gebildeten Doppelstränge von den verbleibenden Einzelsträngen erfolgte durch Chromatographie über Hydroxylapatit bei 60 °C. Einzelstränge wurden mit 0,14 M Phosphatpuffer und Doppelstränge mit 0,4 M Phosphatpuffer eluiert und die Aktivität der Gesamteluate im Szintillationszähler gemessen.

Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Ort der lebenslangen Persistenz und den Ort der Produktion von EBV im menschlichen Körper zu identifizieren (2, 3).

Alle gebräuchlichen Methoden zum Nachweis von Viren sind für die Untersuchung der Persistenz ungeeignet, da nicht ohne weiteres angenommen werden kann, daß virale Genome während der Persistenzphase auch tatsächlich exprimiert werden. Histologie, Immunfluoreszenz und

Elektronenmikroskopie können daher nicht sinnvoll eingesetzt werden. Es ist jedoch vor einiger Zeit gelungen, eine Methode zum direkten Nachweis einer spezifischen viralen DNA in Biopsiematerialien zu entwickeln (7). Mit dieser Methode können relativ effektiv verschiedene Gewebeproben auf ihren Gehalt an EBV-Nukleinsäure untersucht werden.

Die Abbildung 1 zeigt *in-situ*-Hybridisierungen mit Ausstrichen von P 3 HR-1-Zellen (eine virusproduzierende Zelllinie) sowie Gefrierschnitten von Tonsillen und Ohrspeicheldrüsen. Die Zellgrenzen sind nicht deutlich, da sie bei der Präparation beschädigt werden. Die geschwärzten Granula gelten als Nachweis von Epstein-Barr Virus-DNA. Hier haben sich Doppelstränge aus radioaktiv markierter Epstein-Barr Virus-DNA und DNA mit entsprechenden Sequenzen des Präparates gebildet.

In A handelt es sich um Ausstriche von P 3 HR-1-Zellen, von denen vereinzelte eine kräftige Granulierung aufweisen. Diese Granulierung ist der Nachweis von EBV-Genomen in den Zellen, die gerade Virus produzieren und damit viel virale DNA (bis zu 10 000 Moleküle) enthalten.

Die Tonsille (B) zeigt keine Granulierung. Dagegen zeigen die Abbildungen C, D und E deutlich vereinzelte granuliert Zellen. In D liegen die Granula marginal im Kernrandgebiet. Ein randständiges Chromatin wird typischerweise in Zellen gefunden, die mit Herpes-Viren, zu denen auch EBV gehört, infiziert sind.

In C handelt es sich wohl um eine produzierende Zelle, sie ähnelt den EBV-produzierenden Zellen der P 3 HR-1-Zelllinie (siehe A).

Wie die Abbildung E zeigt, sind die EBV enthaltenden Zellen häufig in der Nähe der Ausführungsgänge der Speicheldrüse lokalisiert.

Es scheint, daß die Menge der viralen DNA in den Parotiszellen in der Regel geringer ist als in den Zellen der P 3 HR-1-Zelllinie, in denen eine Virussynthese abläuft. Dies ist nicht unerwartet, da die Vermehrung von EBV, wie bei allen DNA-Viren, immer zu einem Absterben der Wirtszellen führt und damit zu einer größeren Nekrose führen müßte.

Die *in-situ*-Hybridisierung bietet den Vorteil, daß virale DNA in ihrer Lokalisation im Gewebe nachgewiesen werden kann. Da die Nukleinsäuren in der Zelle jedoch nicht völlig frei vorliegen, besteht bei dieser Technik die Gefahr, daß die zugegebene radioaktive Virus-DNA nicht spezifisch an virale DNA in der Zelle, sondern, zum Beispiel über DNA-bindende Proteine, unspezifisch gebunden wird. Diese Fehlermöglichkeit kann nur durch geeignete Kontrollen oder besser durch Absicherung mit einer anderen Untersuchungsmethode ausgeschlossen werden. Die Zellen der Tonsille und negative Zellen in Parotisschnitten in direkter Nachbarschaft der positiven Zellen sind bereits gute Kontrollen. Wir haben darüber hinaus jedoch die Methode der Reassoziationskinetik (siehe Methoden) verwendet, um spezifische Reaktionen sicher auszuschließen. Da bei dieser Methode von hochgereinigter DNA ausgegangen wird und alle Schritte unter Bedingungen durchgeführt werden können, die höchste Spezifität erlauben, sind diese Ergebnisse als kritische Kontrolle der *in-situ*-Hybridisierungen zu werten.

Die Abbildung 2 zeigt die Ergebnisse der Reassoziationskinetik. Es wurden mehrere Gaumentonsillen, drei Parotiden sowie positive und negative Kontrollen (siehe Methoden) untersucht.

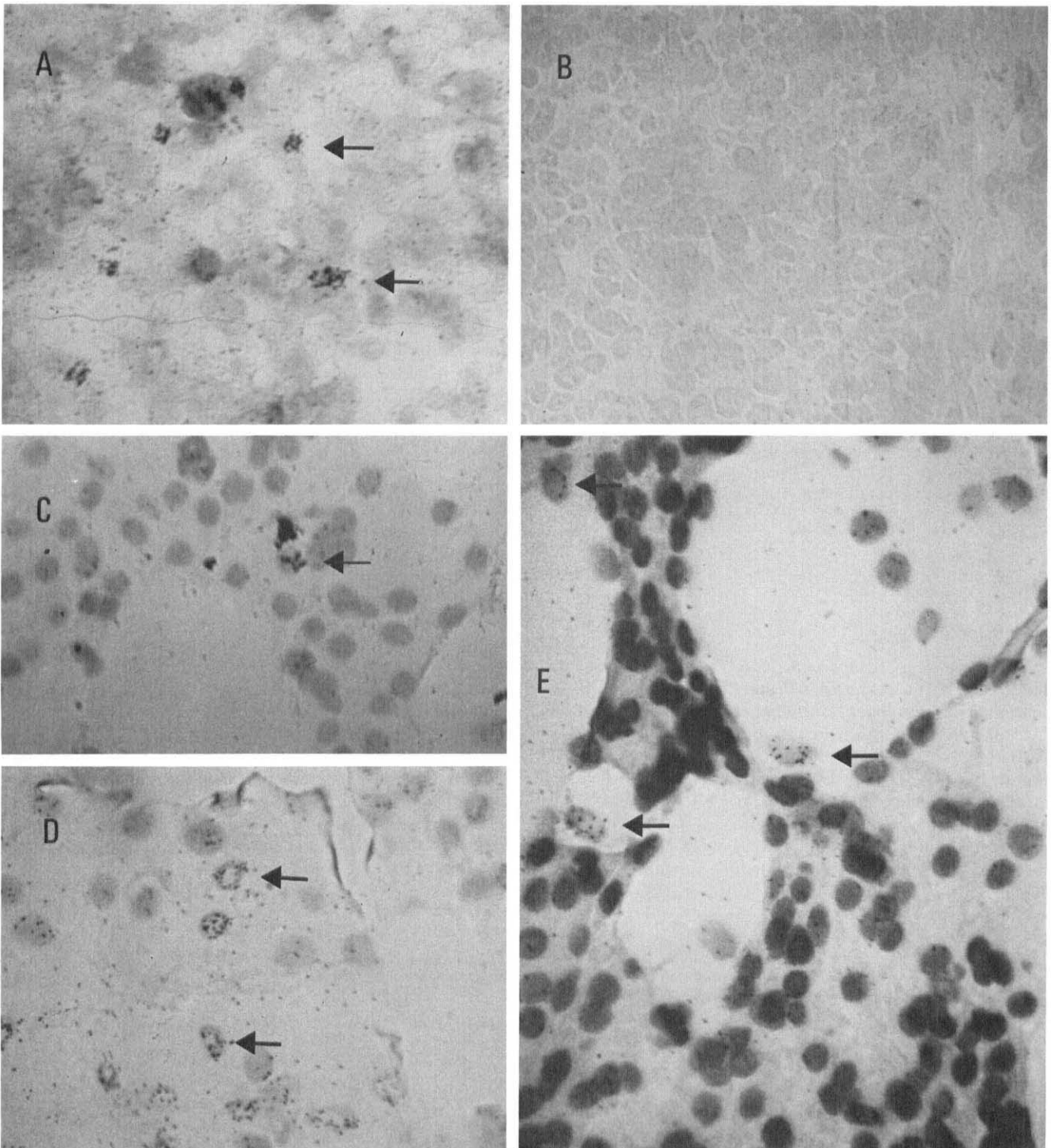


Abb. 1 A = virusproduzierende Zelllinie (P3HR-1), einzelne positive Zellen; B = Gaumentonsille, negativ; C = Gl. parotis, positiv, enthält möglicherweise eine virusproduzierende Zelle; D = Gl. par-

otis, positiv, Granula marginal im Kern lokalisiert; E = Gl. parotis, positiv, granulohaltige Zellen sind an einem ausführenden Gang lokalisiert.

Die Kinetiken zeigen klar, daß alle untersuchten Tonsillen, eine davon war ca. 10 Tage nach Beginn der klinischen Erscheinungen einer infektiösen Mononukleose entnommen worden, negativ sind. Eine Ohrspeicheldrüse enthält, umgerechnet vom Gehalt

an DNA auf die Gesamtzellzahl, ca. 5 virale DNA-Genome je Zelle; die beiden anderen Parotiden enthielten etwa $1/10$ der Menge viraler DNA. Die Ergebnisse der *in-situ*-Hybridisierung konnten in vollem Umfang durch die Methode der Reassoziationskinetik bestätigt werden.

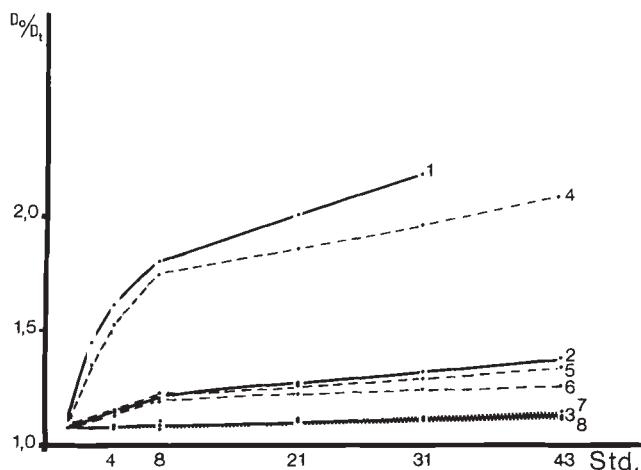


Abb. 2 Die Abb. 2 zeigt die Geschwindigkeit, mit der doppelsträngige Virus-DNA aus Einzelsträngen gebildet wird (Reassoziationskinetik); D_0 = Gesamtmenge viraler DNA (Doppelstränge und Einzelstränge); D_t = zum Zeitpunkt t vorhandene Menge einzelsträngiger DNA; 1 = 200 $\mu\text{g/ml}$ Raji-DNA + Kalbsthymus-DNA; 2 = 20 $\mu\text{g/ml}$ Raji-DNA + Kalbsthymus-DNA; 4, 5 u. 6 = DNA-Präparationen von Ohrspeicheldrüsen; 5, 6, 7 u. 8 = DNA-Präparationen von Gaumentonsillen.

Diskussion

Das Epstein-Barr-Virus wurde 1964 in Zellkulturen von Lymphomen entdeckt (Epstein und Barr 1964). Virologische und immunologische Untersuchungen zeigten, daß B-Lymphozyten die natürlichen Zielzellen von EBV sind. Eine Ausnahme bilden die Epithelzellen des Nasopharynxkarzinoms, die ebenfalls EBV-DNA enthalten (7). In vitro gelang es allerdings nicht, Epithelzellen mit EBV zu infizieren.

Die Replikation von EBV, das heißt die spontane Aktivierung des latenten Virus mit Bildung neuer Viren im Organismus, ist selten. Es ist bisher nicht gelungen, in frischen

Biopsiematerialien oder peripheren Leukozyten sogenannte späte virale Antigene oder Viruspartikel sicher nachzuweisen.

Die Herkunft von Epstein-Barr-Viren im Speichel war daher umstritten. Man vermutete, daß diese aus dem lymphozytenreichen *Waldeyerschen Rachenring* stammten.

Es wäre jedoch denkbar, daß EBV-Genomtragende Lymphozyten in diesen lymphozytenreichen Geweben einer abgeschwächten Kontrolle des Organismus unterliegen und gelegentlich einen lytischen Zyklus bzw. eine Virusvermehrung zulassen.

Sollte diese Annahme zutreffen, dann müßten Virusgenome in den Tonsillen zu finden sein.

Mit Hilfe von Nukleinsäurehybridisierungen untersuchten wir daher Gewebe aus Tonsillen und Parotiden auf Epstein-Barr Viren. Wir fanden das Virus-Genom nur in den großen Ohrspeicheldrüsen, während die Gaumentonsillen negativ waren. Die Parotiden enthielten zwar weniger EBV-Genome als die virusproduzierenden P3 HR-1-Zellen, jedoch finden sich signifikant nachweisbare Mengen.

Die gelegentlich gefundenen Zellen mit einem offensichtlich höheren Gehalt an viraler DNA, der dem der virusproduzierenden P3 HR-1-Zellen gleichkommt, gemeinsam mit dem Nachweis von EBV im Stenonschen Ausführungsgang der Ohrspeicheldrüsen (5) machen es wahrscheinlich, daß Epstein-Barr-Virus in der Parotis auch in geringerem Umfang vermehrt wird.

Unsere Befunde sprechen dafür, daß das biologische Verhalten des Epstein-Barr-Virus dem Erreger der Marekschen Erkrankung bei Hühnern ähnelt.

Die für diese Erkrankung verantwortlichen Viren persistieren in T-Lymphozyten, werden aber in anderen Geweben, dem Epithel der Federfollikel, produziert (1).

Die Anwesenheit der Epstein-Barr-Viren im Speichel und die lebenslang persistierenden Antikörper gegen EBV finden nach unseren Befunden ebenfalls eine Erklärung der Tatsache, daß die Parotis ein natürliches Zielorgan für den Epstein-Barr-Virus ist, indem es lebenslang persistiert und in geringer Anzahl produziert wird.

Literatur

- (1) Calnek, B. W., S. B. Hitchner: Localisation of viral antigen in chickens infected with Marek's disease herpes virus, *J. nat. Cancer-Inst.* 43 (1969) 935
 2. Gerber, P., S. Lucas, M. Nonoyama, E. Perlin, L. J. Goldstein: Oral excretion of Epstein-Barr virus by healthy subjects and patients with infectious mononucleosis. *The Lancet* 11 (1972) 988
 (3) Golden, H. D., R. S. Chang, W. Prescott, E. Simpson, T. Y. Cooper:

- Leukocyte-transforming agent: prolonged excretion by patients with mononucleosis and excretion by normal individuals. *J. Infect. Dis.* 127 (1973) 471
 (4) Jondal, M., G. Klein: Surface markers on human B and T-lymphocytes. II. Presence of EB-virus receptors on B-lymphocytes. *J. Exp. Med.* 138 (1973) 1365
 (5) Morgan, D. G., G. Miller, J. C. Niederman, R. W. Smith, J. M. Dowdliby: Site of Epstein-Barr virus replication in the oropharynx. *The Lancet* 1 (1979) 1154

- (6) Pattengale, P. K., R. W. Smith, P. Gerber: Selective transformation of B-lymphocytes by EB-virus. *Lancet* II (1973) 93
 (7) Wolf, H., H. zur Hansen, V. Bekker: EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. *Nature New Biol.* 244 (1973) 245

- (8) Wolf, H., J. Werner, H. zur Hansen: EBV-DNA in non lymphoid cells of nasopharyngeal carcinomas and in a malignant lymphoma obtained after inoculation of EBV into cottontop marmosets. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* XXXIX (1975) 791

Dr. med. E. Wilmes
 Universitäts-HNO-Klinik München
 Marchioninistraße 15, 8000 München 70

Priv.-Doz. Dr. med. habil. Dr. rer. nat. Hans Wolf
 Max-von-Pettenkofer Institut der Universität München