

SAMENVATTING

Epstein-Barr virus (EBV) is een algemeen voorkomend infectieus agens (Humaan herpesvirus 4, HHV4) met unieke biologische eigenschappen, die kunnen leiden tot diverse benigne en maligne ziekten, afhankelijk van de interactie met gastheer- of omgevingsfactoren. Nasofarynx carcinoma (NPC) heeft een incidentie van minder dan 1/100.000 in westerse landen en Japan, maar heeft een intermediaire (1-6/100.000) tot een hoge (>6/100.000) incidentie in de meest gebieden in Zuid-Oost Azië, China en Noord-Afrika. Het ongedifferentieerde type NPC (WHO type III) is de meest frequente vorm en heeft bijna 100% correlatie met EBV infectie. Bij NPC met WHO type II en I bestaat een lagere correlatie, van respectievelijk 70% en 10%. De EBV-NPC associatie is aangetoond door EBV genoom klonaliteit in de tumor en actieve expressie van virale genen in alle tumorcellen. Verder zijn in het perifere bloed van NPC patiënten verhoogde EBV-DNA niveaus en veranderde antilichaamreacties tegen diverse EBV eiwitten te detecteren.

De meeste NPC patiënten komen in een (te) laat stadium van de maligniteit naar de kliniek, waardoor gecompliceerde therapie noodzakelijk is, de genezingskans laag is en de ziekte vaak progressief is. Biopsie is het voornaamste diagnostisch middel voor het bepalen van de maligne status. Daarnaast kan NPC worden geïdentificeerd door detectie van verhoogde titers van IgG en IgA tegen EBV-gecodeerde eiwitten EBNA1, EA en VCA in het serum middels indirecte immunofluorescentie technieken (IFA). IFA is echter een bewerkelijk en onderhevig aan subjectieve interpretatie en het is niet geschikt voor gebruik op grote schaal. Om de IFA te vervangen is ELISA test ontwikkeld, wat een simpele, gevoelige en beter gestandaardiseerd diagnostisch systeem geeft dat ook geschikt is voor geautomatiseerde "hoge doorvoer" testen. Voor deze ELISA methode was het noodzakelijk een (beperkt) aantal gedefinieerde EBV antigenen te combineren in één mix voor het meten van de IgG/ IgA reactiviteit voor meerdere EBV antigenen in NPC. Recentelijk, is kwantificering van het EBV-DNA in bloedplasma voorgesteld voor primaire diagnose, het monitoren van therapie en het voorspellen van recidive. Echter toepassing van EBV-DNA kwantificering voor routinegebruik in ontwikkelingslanden wordt belemmerd door hoge kosten, infrastructurele en logistieke problemen.

In dit proefschrift wordt de ontwikkeling van een IgA anti-EBV gebaseerde ELISA en het testen van de hoeveelheid EBV-DNA beschreven, die tot verbetering van de NPC diagnostische technieken moeten leiden. Allereerst hebben we de moleculaire complexiteit van de IgG en IgA anti-EBV antilichamen in NPC patiënten geanalyseerd. Hierna hebben wij verschillende typen EBV antigenen onderzocht, die gebruikt kunnen worden in een een-staps IgA ELISA. Als derde hebben we een real-time PCR gebruikt voor de kwantificatie van EBV-DNA in volbloed en nasofaryngeale (NP) uitstrijkjes. De analyse van NP uitstrijken is een niet invasieve en zeer handige methode om de aanwezigheid van NPC in situ in het nasofaryngeale gebied aan te tonen en zou de invasieve en pijnlijke biopsie als diagnostische procedure kunnen vervangen. Wij propageren een combinatie van serologie met moleculaire testen voor screening van personen met een hoog risico op NPC, als wel diegenen met non-specifieke klachten wijzend op een mogelijk vroeg stadium NPC. Voor de dagelijkse kliniek en in het veld zouden wij een simpele monsterafname willen suggereren zonder de gevoeligheid en specificiteit van het systeem te verminderen.

In **hoofdstuk 2** hebben we de moleculaire diversiteit van de IgG en IgA antilichaam reacties in gezonde personen en NPC patiënten uit hoog, gemiddeld en lage endemische gebieden gekarakteriseerd middels immunoblot. Wij zagen dat bij gezonde individuen en NPC patiënten uit de verschillende endemisch gebieden de karakteristieken van de IgG en IgA reactiepatronen tegen EBV overeenkomstig waren. Gezonde EBV dragers laten een beperkte IgG reactiviteit zien met geringe diversiteit gericht tegen EBNA1 en VCA-p18 en soms tegen VCA-p40 en ZEBRA, terwijl zij

een negatieve of zwakke IgA reactiviteit hebben tegen EBV antigenen. Aan de andere kant, hebben NPC patiënten een sterke en grotere diversiteit van IgG en IgA reacties tegen de verscheidene types van EBV antigenen, wat een indicatie geeft voor een andere antigene stimulatie. De individuele IgG en IgA reactiviteit gaf geen correlatie met de parallele resultaten van de IFA titratie. Wij konden middels de immunoblot de diagnostisch waarde van de individuele EBV eiwitten uit de EA en VCA complexen bestuderen, wat onmogelijk was met de IFA technieken. IgG reactiviteit tegen EBV liet een correlatie zien met het stadium van de maligniteit en zou gebruikt kunnen worden voor het voorspellen van een recidive. Hoewel de analyse van IgG EBV patronen met behulp van een immunoblot een waardevolle diagnostische en prognostische test kan zijn, zijn voor deze methode nog steeds celweekfaciliteiten nodig om de antigenen te produceren, en is de interpretatie van test subjectief. Aan de andere kant kan deze methode wel gebruikt worden voor de selectie van gedefinieerde EBV eiwitten die geschikt zijn voor de ontwikkeling van een ELISA, zodat niet de complexe antigenen mixen gebruikt moeten worden zoals in de IFA. Gezuiverde antigenen uit EBV-geïnfecteerde B-cellen, recombinant EBV eiwitten of synthetische peptiden kunnen gebruikt worden in een ELISA systeem voor het detecteren van antilichaam reacties specifiek voor NPC patiënten.

In **hoofdstuk 3** hebben we het gebruik van twee synthetische peptiden in een IgA ELISA geanalyseerd. De synthetische peptiden van EBNA1 en VCA-p18 bestaan uit een combinatie van immunodominante epitopen gedefinieerd via PEPSCAN analyse en ieder voor zich geproduceerd als een enkel lang (ongeveer 60 aa) multi-epitope peptide. Deze synthetische peptiden zijn alleen of in combinatie gebruikt voor IgA detectie (IgA-EBV ELISA). Vergeleken met de IgG-EBV ELISA maakt de IgA-EBV ELISA een goed onderscheid tussen de gezonde en de NPC populatie. Dit bevestigt de stelling dat IgA reactiviteit tegen EBV een kenmerk is van NPC. De IgA EBV ELISA reactiviteit correleert niet met het stadium van de ziekte, wat mogelijk veroorzaakt wordt door de beperkte aantallen van patiënten met een vroeg stadium NPC. Dit systeem kan echter acute infectieus mononucleosis (IM) en chronische EBV uitsluiten. Deze IgA-EBV ELISA laat een gevoeligheid en specificiteit, PPV en NPV zien van respectievelijk 85.4, 90.1, 78.7, en 93.9%, hoger dan die van de IgA ELISA met individuele antigenen (waarbij opgemerkt kan worden dat een recentelijk gemodificeerde methode gebruik makend van een hoge binding ELISA plaat een nog hogere sensitiviteit van 90% gaf, ongepubliceerde data). Vergelijkbare diagnostische waarden zijn gevonden voor de IgA-EBV-ELISA in een Chinese NPC populatie afkomstig uit Hongkong met een gevoeligheid en specificiteit, PPV en NPV van respectievelijk 91.1, 81.5, 95.6, and 89.3 %. Deze data illustreren de diagnostische potentie van de IgA-EBV ELISA voor toepassing in de Indonesische en Chinese populatie. De synthetische peptide gebaseerde EBV-IgA ELISA biedt een goedkope, gevoelige en specifieke manier voor de diagnose van NPC, bruikbaar voor standaardisatie en gebruik op grote schaal. Derhalve stellen wij voor deze methode voor het screenen van NPC en routine diagnostiek in Indonesië en elders in te zetten.

NPC is geassocieerd met de humorale immuun reactiviteit tegen meerdere EBV antigenen. De peptide gebaseerde IgA-ELISA hierboven beschreven mist nog enkele geconfirmeerde NPC gevallen en behoeft daarom verdere optimalisatie. Voor het identificeren van additionele bruikbare antigenen hebben wij de moleculaire diversiteit van de tegen EBV gerichte antilichamen verder gekarakteriseerd in biopsie-bevestigde NPC patiënten, die een negatieve reactie in de peptide IgA-EBV ELISA lieten zien. Wij hebben tevens de antilichaamreactiviteit tegen verscheidene individuele recombinant en peptide gebaseerde alternatieve EBV antigenen geanalyseerd, maar geen van allen gaf een bevredigend resultaat voor de verbetering van het IgA-EBV ELISA systeem (data niet getoond). In **hoofdstuk 4**, laat de analyse van IgG immunoblot strips een 100% reactiviteit tegen VCA-p40 (BdRF1) en VCA-p18 (BFRF-3) zien en minder tegen de

andere EBV antigenen. Eerdere ongepubliceerde data lieten zien dat PEPSCAN analyse immunodominante (lineaire) epitopen van BDRF1 niet kon aantonen. Geconcludeerd werd dat VCA-p40 epitopen sterker herkend werd via conformationele dan via sequentie-gebaseerde domeinen. Een recombinant eiwit werd gemaakt door een fusie van het volledige BDRF1 eiwit met het BFRF3 gecodeerde dominante VCA-p18 epitoom en dit werd tot expressie gebracht in *E.coli*. Het recombinante eiwit werd gezuiverd door middel van metaal affiniteit chromatografie via een histidine-tag op het einde van het eiwit. Door gebruik te maken van een hoge zoutconcentratie en graduele verhoging van imidazol konden wij het VCAp40-p18 eiwit zuiveren, wat resulteerde in een 55kDA eiwit. Expressieniveaus en zuiveringsefficiëntie behoeven nog optimalisatie. Desondanks konden we het gezuiverde recombinant eiwit gebruiken in een IgA/VCAp40+18 ELISA (IgA-VCA ELISA) om een NPC panel te testen, bestaande uit patiënten met negatieve en positieve IgA-EBV ELISA. De IgA-VCA ELISA detecteerde 63.6%(14/22) en 95% (19/20) monsters die respectievelijk negatief en positief waren in de peptide gebaseerde IgAEBV ELISA. Wanneer de IgA-VCA ELISA gecombineerd werd met het grote NPC panel, wat al eerder getest was met de IgA-EBV ELISA (n=562), dan zien we de gevoeligheid van 90% naar 96.2% stijgen. De VCAp40+18 zou gecombineerd kunnen worden met het synthetische EBNA1 combi-peptide in de ELISA test, zodat het kan dienen als een zeer gevoelige NPC diagnostische test. Hiernaast zou het VCAp40+18 recombinant eiwit ook potentieel gebruikt kunnen worden voor de diagnose van acute mononucleosis (Ziekte van Pfeiffer).

Het gebruik van een IgA-EBV gebaseerde ELISA als een screening in het veld, zou begeleidt moeten worden met de ontwikkeling van een geschikte, simpele bloedafname methode moeten. In **hoofdstuk 5** hebben wij een filter met gedroogd bloed (DBS) vergeleken met bloed direct afgenomen van een vingerprik of via een vacuümbuis uit de arm. Het serum wat geëluëerd werd van het filter liet gelijke OD-waarden zien als vers of ingevroren serum gebruik makend van de IgA-EBV ELISA, met een r^2 rond 0.9. De enige limitatie was afname van voldoende volume bloed voor het druppelen op het filter (3 grote druppels; ~100ul). Dit hoofdstuk liet ook zien dat Whatman #3 filter papier kan dienen al een alternatief voor het (dure) standaard S&S #903 filterpapier. DBS liet zien dat de reactieve IgG/ IgA antilichamen behouden blijven wanneer het over een langere tijd bewaard werd in een droge koude kamer. De houdbaarheid van IgG/IgA was gereduceerd wanneer het filter bewaard werd bij hogere temperaturen, hoewel het voldoende stabiel is om zonder verdere behandeling geurende enkele dagen bij omgevingstemperatuur verstuurd te worden naar het diagnostisch laboratorium. De DBS methode heeft bewezen een goed alternatief te zijn voor het verzamelen van vers bloed met een vingerprik wat een 'vriendelijke' en minder invasieve afnamemethode is gecombineerd met een makkelijke procedure, transport, opslag, waardoor het geschikt is voor grote screeningstudies in de populatie.

In **hoofdstuk 6** hebben we het gebruik van ongefractioneerd volbloed voor EBV DNA kwantificatie geanalyseerd met een gestandaardiseerde LightCycler-PCR (LC-PCR), waarbij een zeer geconserveerde regio in het EBNA1 gen als amplificatie doel gebruikt werd. EBV-DNA kwantificatie werd geïkt via een seriële verdunningen van een bekend aantal EBV genomen als een standaard. Ongefractioneerd volbloed is gekozen omdat het alle bloedcompartimenten vertegenwoordigd. De silica-gebaseerde DNA/RNA-isolatie methode heeft praktische voordelen (eenvoudige procedure, geen dure apparatuur nodig) en er is enkel een klein volume bloed nodig. Het is geschikt om gelijktijdig DNA en RNA te isoleren, terwijl remmende factoren voor de PCR geëlimineerd worden. Volbloed LC-PCR gaf een hoger aantal positieven (85.9%) wanneer een 99 bp amplicon gebruikt werd i.p.v. een 213 bp PCR product (72.5%). Dit is gerelateerd aan het voorkomen van gefragmenteerde EBV-DNA in bloed van de meeste NPC patiënten, wat waarschijnlijk afkomstig is van apoptotische tumor cellen. Wij konden echter maar in een beperkt

aantal NPC patiënten een verhoogde EBV-DNA gehalte detecteren, wat het gebruik als primaire diagnostische marker beperkt. Het EBV-DNA gehalte kan echter bruikbaar zijn in het monitoren van therapie (M. Adham, studie in progress). Het detecteren van EBNA1 mRNA in bloed van enkele NPC patiënten wijst op een verhoogd aantal circulerende B cellen. De afwezigheid van BARP1 RNA in het volbloed indiceert afwezigheid van circulerende NPC tumorcellen. Detectie van EBV-DNA in het volbloed gaf lage waarden voor de diagnostische gevoeligheid en is daardoor van beperkte waarde voor primaire diagnose van NPC.

Wij hebben de LC-PCR verder ontwikkeld voor analyse van het EBV-DNA gehalte in uitstrijkjes afgenomen op de primaire plaats van tumorontwikkeling, het neusholte epithelium. In **hoofdstuk 7**, hebben we het gebruik van niet-invasieve neusholte uitstrijkjes (NP brushing) voor het verkrijgen van cellen uit de tumor getest, waarbij het EBV-DNA werd gekwantificeerd en de RNA expressie patronen werden geanalyseerd. Dit systeem liet een gevoeligheid, specificiteit, PPV en NPV waarden zien van respectievelijk 90, 98, 97, en 91%. Dit is veel hoger dan het ongefractioneerde volbloed. De NP brush kan frequent gebruikt worden voor een tumor inspectie aangezien het een relatief eenvoudige en weinig invasieve methode is vergeleken met de pijnlijke biopsie procedure. Hoog positieve resultaten werden gevonden in patiënten met EBV-DNA negatief volbloed. NP brush biedt een *in-situ* DNA meting welke een directe reflectie is van de EBV biologische tumor activiteit. Daarnaast kon de NASBA techniek de aanwezigheid van EBNA1, LMP2 en BARP1 RNA in 88% van de NP brush monsters detecteren, wat een directe indicatie geeft van aanwezigheid van intacte tumorcellen. BARP1 RNA wordt alleen geëxprimeerd in EBV-gerelateerde carcinomas (niet in lymphomas), en zou verder bestudeerd moeten worden als kandidaat NPC tumor marker.

Concluderend willen we voor de screening en primaire diagnose van NPC in hoog-risico groepen een combinatie voorstellen van de peptide-gebaseerde IgA-EBV ELISA en meting van het EBV-DNA gehalte of BARP1-RNA in NP brushings. Individuen met een risico tot het ontwikkelen van NPC zijn personen met (1) bepaalde chronische klachten in de hoofd en hals regio, (2) omgevingsrisico's (dieet en niet-dieet gebonden), of (3) familiale NPC. Voor deze individuen zou het bloed getest moeten worden op IgA-EBV m.b.v. ELISA. Vingerprik DBS zou een goed middel zijn om bloed te verkrijgen, Hoge IgA-EBV reactiviteit zou bij voorkeur moeten worden bevestigd door een NP brushing, - al of niet met inspectie van de neusholte (nasofarynx) middels nasoendoscopie -, waarbij EBV-DNA of BARP1 RNA gekwantificeerd wordt. Positieve resultaten voor zowel serologie en moleculaire testen zijn sterk indicatief voor NPC aanwezigheid en zouden een sterke aanbeveling moeten zijn voor verder klinisch onderzoek, met een biopsie en een CT-scan voor het definitief definiëren van de NPC locatie. Deze benadering zou mensen met een tumor in een vroeg stadium moeten identificeren, waarna een medische interventie onmiddellijk kan worden toegepast. Aan de andere kant, individuen met een positief test resultaat, maar met negatieve klinisch onderzoek zouden regelmatig gecontroleerd moeten worden (elke 6-12 maanden) op klinische en EBV-gebaseerde laboratorische waarden aangezien het positieve resultaat suggereert dat er zich een (klinisch obscuur) vroeg stadium NPC ontwikkelt. Hoge en stijgende waarden van IgA-EBV en EBV-DNA zouden oplettendheid moeten verhogen op tumor progressie. Naast primaire diagnostiek zou de IgA-EBV ELISA in combinatie met de EBV-DNA bepaling van de nasofarynx ook gebruikt kunnen worden voor analyse van de dynamiek van de IgA-EBV en EBV-DNA niveaus in de nasopharynx gedurende en na de chemo- en bestralingbehandeling gekoppeld aan het voorspellen van remissie (dalende waarden) en persistente ziekte of een recidive (stijgende waarden) van de lokale primaire tumor. Verhoogde EBV-DNA gehalten in het bloed reflecteren apoptosis van de tumorcellen en zouden nuttig kunnen zijn voor het monitoren van de effectiviteit van de therapie. Dit moet verder bestudeerd worden.

De directe link tussen de veranderde EBV activiteit en NPC pathogenese maakt het mogelijk om gedefinieerde (anti-)virale markers voor diagnose, prognose en therapeutische monitoren. De ontwikkeling van moleculaire en immunologische testen in dit proefschrift kunnen bijdragen aan een wijd verbreide applicatie van dit concept in de ontwikkelingslanden, waardoor de detectie van vroeg stadia NPC en kanker gerelateerde gezondheidszorg.