

## CHARAKTERYSTYKA BIAŁEK WIRUSA EPSTEINA-BARR – ICH UDZIAŁ W ZAKAŻENIU LATENTNYM I POWIĄZANIE Z PROCESAMI NOWOTWORZENIA

Anna Żuk-Wasek\*

Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego-Państwowy Zakład Higieny  
ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

Wpłynęło w kwietniu 2012 r.

1. Wprowadzenie. 2. Perspektywa historyczna. 3. Budowa genomu. 4. Zakażenie pierwotne – mechanizmy wnikania wirionów i replikacji EBV. 5. Molekularne podstawy zakażenia latentnego EBV. 6. Białka fazy latentnej. 7. Reaktywacja zakażenia latentnego. 8. Wirusowe homologi białek komórkowych. 9. Właściwości onkogenne EBV. 10. Nowotwory powiązane z EBV. 11. Podsumowanie

### Characterization of Epstein-Barr virus proteins – their participation in latency and relation to oncogenesis

Abstract: Although the Epstein-Barr virus (EBV) infects more than 90% of the human population, the infection can have a broad range of health consequences. The primary infection usually occurs during childhood, without any symptoms or with a mild illness. During adolescent infection mononucleosis occurs in around 50% of individuals. This most extensively studied gammaherpesvirus is also associated with various human malignancies such as Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas, Burkitt's lymphoma, nasopharyngeal carcinoma, AIDS-related lymphoproliferative disorders and X-linked lymphoproliferative disorder (Duncan's disease). All these tumors are associated with the EBV latency cycle. Latently infected lymphocytes express the six nuclear antigens (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C and -LP), three latent membrane proteins (LMP-1, -2A and -2B) and small, non-polyadenylated RNAs (EBER-1 and EBER-2). EBV can transform and immortalise resting B-cells in cultures, which suggests that it may have oncogenic specificity. EBV has broad spectrum of proteins, which mimic cellular proteins regulating cell cycle (BCRF-1, BDLF-2, BARF-1 and BHRF-1). These proteins interact with or exhibit homology to a wide variety of antiapoptotic molecules, cytokines and signal transducers, hence promoting EBV infection, immortalization and transformation.

1. Introduction. 2. Historical perspectives. 3. Genome structure. 4. Primary infection-mechanisms of virion invasion and EBV replication. 5. Molecular aspects of latent EBV infection. 6. Latent proteins. 7. Reactivation from latency. 8. Viral homologues of cellular proteins. 9. Oncogenic properties of EBV. 10. Cancers connected with EBV. 11. Summary

**Słowa kluczowe:** białka latentne, EBV, latencja, nowotwory

**Key words:** Latent proteins, EBV, latency, cancers

### 1. Wprowadzenie

Wirus herpes typu 4 (HHV-4), powszechnie nazywany od nazwisk odkrywców wirusem Epsteina-Barr (EBV), należy do podrodziny *Gammaherpesvirinae*, rodziny *Herpesviridae*. Wspólną cechą tej rodziny jest zdolność ustalania latencji w komórkach gospodarza. Podrodzina gammaherpeswirusów, do której oprócz EBV należy także herpeswirus typu 8 (HHV-8) wyróżnia się nie tylko zdolnością do ustalania latencji w limfocytach, lecz także zdolnością do pobudzenia ich proliferacji [74]. Znane są dwa podtypy wirusa herpes typu 4: EBV-1 i EBV-2 różniące się między sobą regionem kodującym antygen jądrowy wirusa Epsteina-Barr (EBNA). Istnieje różnica w lokalizacji geograficznej obu typów wirusa: EBV-1 jest częściej spotykany i dominuje w Europie, EBV-2 wyodrębniony został w Afryce Centralnej i w Nowej Gwinei [27, 90].

Według różnych źródeł zakażonych EBV jest 90–95%, a w krajach rozwijających się nawet 100% populacji.

Zakażenie najczęściej szerzy się drogą kropelkową, rzadziej przez przetoczenie preparatów krwiopochodnych i przeszczepy. Okres inkubacji wynosi 30–50 dni [62].

### 2. Perspektywa historyczna

W 1958 roku Denis Burkitt prowadził w Afryce badania nad nowotworem rozwijającym się u dzieci mieszkających w rejonach dotkniętych malarią. W swojej pracy wysunął śmiałą na owe czasy hipotezę, że czynnikiem etiologicznym tego chłoniaka może być wirus [7]. W 1961 roku z pracą tą zapoznał się patolog i ekspert mikroskopii elektronowej Michael Epstein. W 1963 roku otrzymał on z Ugandy próbki a w 1964 Michael Epstein i Yvonne Barr wyprowadzili z biopsji chłoniaka Burkitta (BL) linię komórkową i odkryli w niej wirusa, który od ich nazwisk został nazwany wirusem Epsteina-Barr [20, 21]. W surowicach osób chorych na BL stwierdzono również wyższy

\* Autor korespondencyjny: Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego-Państwowy Zakład Higieny, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa, tel. 0(22) 54-21-230, e-mail: azuk@pzh.gov.pl

poziom przeciwciał przeciwko EBV niż u osób zdrowych. W 1968 roku Henle wykazał związek pomiędzy zakażeniem EBV a mononukleozą zakaźną [36]. W tym samym roku Pope udowodnił, że EBV może unieśmiertniać limfocyty ludzkie [68]. W 1975 roku w komórkach chłoniaka Burkitta i raka jamy nosowo-gardłowej (NPC) metodą hybrydyzacji wykryto obecność DNA EBV [63]. Dzięki tym eksperymentom oraz doświadczalnemu wywołaniu chłoniaków u naczelnych poprzez zakażenie ich wirusem Epsteina-Barr udowodniono, że EBV jest wirusem powiązany z rozwojem nowotworów. Było to pierwsze odkrycie wykazujące udział wirusa w procesie powstawania nowotworów [80]. Obecnie EBV uważany jest również za istotny czynnik ryzyka w rozwoju raka jamy nosowo-gardłowej, oraz innych chorób nowotworowych układu krwiotwórczego.

### 3. Budowa genomu

Wirus Epsteina-Barr zbudowany jest z ikosahedralnego kapsydu składającego się ze 162 kapsomerów, o średnicy około 100 nm, który okrywa dwuniciową cząsteczkę kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA). Kapsyd otoczony jest tegumentem czyli wnিকającą między kapsomery warstwą białkową i osłonką, którą tworzy podwójna warstwa lipidowa z glikoproteinami (Rys. 1A). Osłonka zawiera antygeny, które wiążą swoiste przeciwciała neutralizujące wirusa i często również receptor dla Fc fragmentu immunoglobuliny.

Genom EBV to cząstka linearnego, dwuniciowego DNA, długości 172 kbp, kodującego ponad 85 genów (Rys. 1B). Składa się z sekwencji krótkiej i długiej, zawierającej fragmenty powtórzone, sekwencje wewnętrznie powtórzone i terminalne.

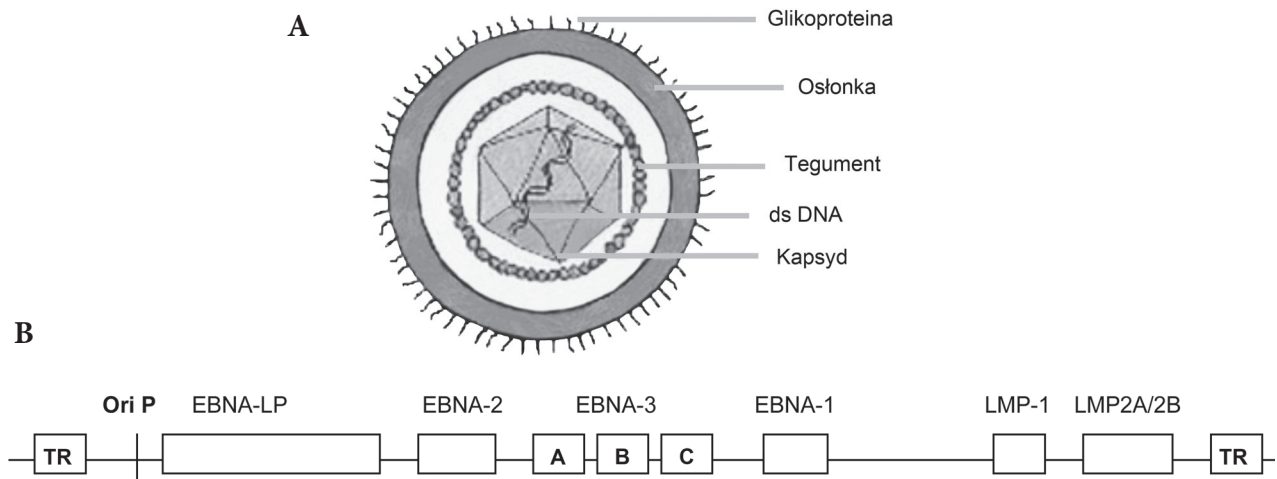
Po fuzji z komórką gospodarza nukleokapsyd uwalniany jest do cytoplazmy a materiał genetyczny transportowany do jądra komórkowego. W zakażonej

komórce genom wirusa przyjmuje zazwyczaj formę pozachromosomalnego, kolistego episomu, ale czasami może też ulegać integracji z chromosomami w formie linearnego DNA. Forma episomalna związana jest z fazą latentną, liniowa z fazą lityczną wirusa [47, 73].

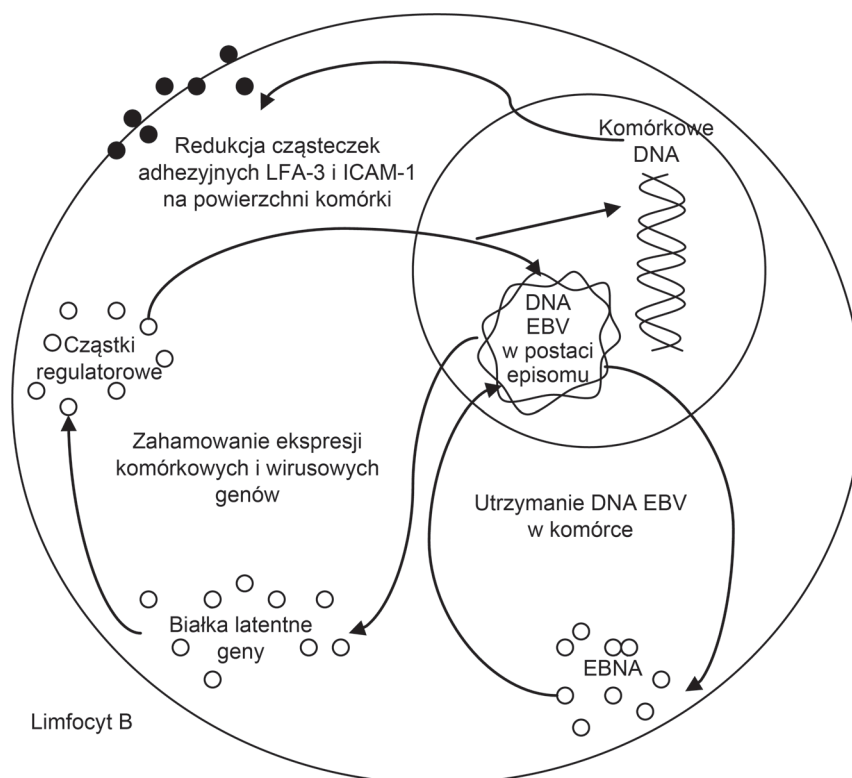
### 4. Zakażenie pierwotne – mechanizmy wnikania wirionów i replikacji EBV

Zakażenie pierwotne zaczyna się w jamie nosowo-gardłowej. Następuje tam fuzja wirionów z komórkami epitelialnymi oraz limfocytami B. Rzadziej wirus zakaża limfocyty T bądź komórki NK (natural killer) [89]. Do limfocytów B wirus wnika do komórki łącząc się białkami osłonki: gp350 i gp220 z receptorem komórkowym CD21, który jest także receptorem składowej dopełniacza C3d. Chociaż część limfocytów T może prezentować CD21 to jednak mechanizm wnikania do komórek T i NK nie jest do końca wyjaśniony. Komórki epitelialne nie posiadają w ogóle receptora CD21, zatem EBV musi wykorzystywać inny receptor [47, 48]. Proces ten jest przedmiotem wielu badań i pojawiają się doniesienia o wykorzystaniu jako alternatywnej drogi wnikania do komórek epitelialnych między innymi receptora IgA, Czy wykorzystania kompleksu glikoproteinowego gHgL do wiązania integryny  $\alpha\beta6$  i  $\alpha\beta8$  [13, 40, 96].

Po 4 godzinach od zakażenia rozpoczyna się ekspresja EBNA-2 (Epstein-Barr Nuclear Antigen-2) i EBNA-LP (Epstein-Barr Nuclear Antigen-Leader Protein), a w następstwie deregulacja cyklu komórkowego i indukcja czynników wzrostu. Po 12 godzinach następuje ekspresja: LMP-1 (Latent Membrane Protein-1) oraz EBNA-3A, -3B, -3C co powoduje indukcję receptora dla czynników wzrostu, transformację wzrostu komórki, zahamowanie apoptozy i immunomodulację. Po 20 godzinach następuje cyrkularyzacja genomu (tworzenie episomu) EBV i ekspresja EBNA-1 [49].



Rys. 1. A – budowa wirusa Epsteina-Barr, B – schemat budowy genomu EBV



Rys. 2. Schemat wzajemnych oddziaływań pomiędzy białkami EBV, cząstkami regulatorowymi i ekspresją DNA komórkowego i wirusowego

Pomiędzy 24 a 72 godziną od zakażenia komórka gospodarza ulega zmianom morfologicznym: średnica zwiększa się o około 30%, jądro powiększa się i następuje ekspresja HLA-DR [75]. W wyniku działania białek wirusa ekspresji ulega antygen CD23, ligand dla CD21, co pozwala przekazywać sygnał pobudzający komórkę do proliferacji. Po 3–4 dniach następuje wejście w fazę S cyklu komórkowego [87]. Jednocześnie z replikacją DNA komórki następuje replikacja DNA wirusa.

W ponad połowie przypadków pierwotne zakażenie EBV przebiega bezobjawowo lub bardzo łagodnie. W wieku młodzieńczym zakażenie może przybierać postać mononukleozy zakaźnej (IM), samoograniczającej się choroby limfoproliferacyjnej krwi. Wśród występujących dość sporadycznie powikłań wymienia się zespół Guillaina-Barra lub inne objawy ze strony układu nerwowego. Niezwykle rzadko dochodzi do rozwoju przewlekłego zakażenia EBV [16, 19].

## 5. Molekularne podstawy zakażenia latentnego EBV

Odpowiedź immunologiczna, zarówno humoralna jak i komórkowa nie eliminuje EBV z zakażonego organizmu. Wirus ten wykształcił szereg mechanizmów obronnych pozwalających na utrzymywanie infekcji w komórkach gospodarza. Stan latencji ustala się w limfocytach, materiał genetyczny wirusa przyjmuje formę

episomalną, replikuje się i jest przekazywany do komórek potomnych. W odróżnieniu od cyklu litycznego EBV, podczas którego ekspresji ulega ponad 80 antygenów w czasie zakażenia latentnego ma miejsce synteza tylko części białek wirusowych: sześciu antygenów jądrowych (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C, LP), trzech białek membranowych (LMP-1, -2A i -2B) oraz dwóch małych fragmentów RNA (EBERs-1 i -2). Prawdopodobnie ograniczenie ekspresji genów w fazie latencji jest jednym z głównych mechanizmów ucieczki wirusa przed mechanizmami obrony ze strony gospodarza [60].

Na rysunku 2 przedstawiono schemat wzajemnych oddziaływań pomiędzy białkami EBV, cząstkami regulatorowymi i ekspresją DNA komórkowego i wirusowego.

W ustalaniu latencji biorą udział białka: EBNA-1, EBNA-2 i LMP-1, przy czym kluczowe jest EBNA-2, które wraz z EBNA-1 stymuluje promotor LMP-1 [89, 98].

W zależności od ekspresji antygenów wyróżniamy cztery typy latencji. W przypadku latencji typu 0 większość limfocytów spoczynkowych pamięci nie wykazuje ekspresji żadnych antygenów wirusowych, co pozwala im pozostać niewidocznymi dla systemu immunologicznego gospodarza. Typ I latencji związany z ekspresją EBNA-1 i EBERs jest obserwowany w krążących komórkach B podczas ich podziału oraz w chłoniaku Burkitta. W typie II latencji obok EBNA-1 i EBERs ulegają ekspresji także LMP-1 i LMP-2. Ten typ latencji występuje w przypadku raka jamy nosowo-gardłowej,

raka żołądka, choroby Hodgkina i chłoniaka z komórek T. W najbardziej immunogennym typie III latencji dodatkowo wykrywane są białka z rodziny EBNA 3 (-3A, -3B i -3C). Dzieje się tak w przypadku pacjentów poddanych immunosupresji, u których rozwinęła się potransplantacyjna choroba limfoproliferacyjna (PTLD) oraz u chorych na AIDS, u których stwierdzono chłoniaka [30, 37, 98].

## 6. Białka fazy latentnej

EBNA-1 (Epstein-Barr Nuclear Protein-1) to fosfoproteina wiążąca DNA, niezbędna do replikacji i zachowania genomu EBV. Odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu autonomii epizomu EBV w fazie latentnej [57]. Dimery EBNA-1 wiążą się do krótkich sekwencji (DS-dyad symmetry) regionu OriP w genomie wirusa, który zawiera dwa odrębne miejsca wiążące EBNA-1, każdy o wielkości 18 pz. Podczas wiązania się EBNA-1 do OriP wirus wykorzystuje enzymy gospodarza do sterowania wszystkimi niezbędnymi etapami replikacji. Miejsce wiązania EBNA-1 ulokowane jest w pozycji +10 i +30 w dół od promotora Qp. Promotor ten działa w odpowiedzi na wiele czynników transkrypcji zabezpieczając i utrzymując odpowiedni poziom EBNA-1 ale jest on regulowany sprzężeniem zwrotnym przez nadmiar EBNA-1. Lee i wsp. wykazali, że EBNA-1 i Ori P regulują replikację wirusa, jednak nie wyjaśniono do końca mechanizmów tego działania. Wiadomo natomiast, że podczas cyklu latentnego replikacja genomu wirusa jest zsynchronizowana z cyklem komórkowym [3, 46, 51].

EBNA-1 kontroluje podział genomu EBV podczas podziału komórki poprzez łączenie z białkiem EBP2 (EBNA-1 binding protein 2) związanego z chromosomem mitotycznym [49].

Poprzez wiązanie do proteazy HAUSP (herpes-virus-associated ubiquitin-specific protease) EBNA-1 jest zaangażowane w regulację p53, czynnika transkrypcyjnego zaangażowanego w szczególności w aktywację mechanizmów naprawy DNA lub indukcji apoptozy w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. [49].

Białko EBNA-1 warunkuje przeżycie zakażonych limfocytów B ponieważ koduje fragmenty tripletów aminokwasów gly-gly-ala, które blokują degradację białka na drodze proteolizy a w konsekwencji prezentację antygenów wirusowych przez układ HLA I limfocytom cytotoksycznym. [61].

EBNA-1 jest obecne we wszystkich typach latencji, a także jako jedyne z białek typu EBNA jest produkowane także w czasie aktywacji do cyklu litycznego [93].

Białko EBNA-2 (Epstein-Barr Nuclear Protein-2) to główny transkrypcyjny czynnik regulujący ekspresję genów wirusowych. Koordynuje pozytywnie ekspresję genów wirusa w latencji typu III. EBNA-2 posiada

domenę aktywacji transkrypcji, jednak nie wiąże się bezpośrednio z DNA lecz z białkami, które wiążą się z DNA w regionie promotora. Oddziałuje zarówno z wirusowymi jak i komórkowymi promotorami transkrypcji. EBNA-2 aktywuje między innymi promotor LMP-1 oraz LMP-2 (Latent Membrane Protein-1 i Latent Membrane Protein-2). Transaktywuje także wiele genów komórkowych odgrywających kluczową rolę w unieśmiertelnianiu i proliferacji komórki po zakażeniu [95]. Razem z EBNA-LP (Epstein-Barr Nuclear Antigen- Leader Protein) wzmacnia ekspresję receptorów CD23 (powierzchniowych markerów aktywowanych komórek B), pobudzając w ten sposób inne limfocyty do proliferacji, oraz receptora CD21 (ligandu dla gp350). Reguluje pozytywnie również ekspresję wirusowego promotora EBNA-3C oraz komórkowego protoonkogenu c-myc, przez co wpływa na proliferację limfocytów B [79]. EBNA-2 wiąże się specyficznie z RBP-Jk (Retinoblastoma Binding Protein), które wiąże się specyficznie z DNA i jest zaangażowane w ścieżce przekazywania sygnałów Notch. Geny *Notch* kodują powierzchniowe receptory komórkowe, które regulują różnicowanie wielu typów komórek [89, 55]. Mutacja loci *Notch* prowadzi do anomalii: od postrzępienia skrzydełek *Drosophila melanogaster* po rozwój nowotworów w komórkach T u ludzi. EBNA-2 jest też pierwszym białkiem latentnym wykrywanym (razem z EBNA-LP) po zakażeniu EBV [62]. Wyróżniamy dwa typy EBNA-2 różniące się serologicznie, korespondujące z typami EBV-1 i EBV-2 [77].

Po zakażeniu limfocytów B wirusem Epsteina-Barr EBNA-LP, jak wcześniej wspomniano, ulega ekspresji jako jedno z pierwszych białek. Wraz z EBNA-2 uczestniczy w procesie wprowadzania spoczynkowych limfocytów B w fazę G<sub>1</sub> cyklu komórkowego, poprzez wiązanie i inaktywację komórkowego białka p53 i produktu genu supresorowego Rb (retinoblastoma protein) [83]. Wspólnie z EBNA-2 indukuje też promotor LMP-1 w niektórych typach chłoniaka Burkitta oraz ścieżce przekazywania sygnałów Notch. EBNA-LP łącząc się z kompleksem białek komórkowych ISI i X-1 tworzy kompleks HAX-1 (HS-1-associated protein X-1), którego sekwencja aminokwasów wykazuje podobieństwo do komórkowej proteiny Nip3 (nineteen kD interacting protein-3), wchodzącej w interakcję z inhibitorem apoptozy Bcl-2 lub BHRF-1 jego wirusowym homologiem, przez co pełni potencjalnie funkcję regulującą apoptozę zakażonych limfocytów B [56]. EBNA-LP odpowiada także za redystrybucję EBNA-3A w jądrze oraz bierze udział w splicingu RNA (składaniu pre-mRNA) [69].

EBNA-3A, -3B, -3C to białka indukujące proces unieśmiertelniania limfocytów B oraz wywołujące wzmożoną odpowiedź immunologiczną. Białka te kodowane są przez trzy geny sąsiadujące ze sobą w genomie wirusa; sekwencja tych genów jest homologiczna odpo-



wiednio w 84, 80 i 72%. Na podstawie różnic w strukturze EBNA-3A, -3B, -3C wyróżniono dwa typy EBV-1 i EBV-2 [44, 95]. Wszystkie białka z rodziny EBNA-3 oddziałują z czynnikiem RBP-J $\kappa$ , a także z czynnikiem wiążącym Cp-1, który wchodzi w skład ścieżki przekazywania sygnałów Notch. Nadekspresję białek biorących udział w ścieżce Notch obserwowano u ludzi w nowotworach z limfocytów T. Jednak sposób w jaki białka EBNA-3 wpływają na czynnik Cp-1 nie jest do końca poznany [49].

EBNA-3A i EBNA-3C, w przeciwieństwie do EBNA-3B są niezbędne w procesie transformacji i immortalizacji komórek B *in vitro* [62]. EBNA-3C może przełamać punkt kontroli retinoblastomy i znieść supresję genu retinoblastomy w fazie G<sub>1</sub> cyklu komórkowego [84]. Wykazano też, że EBNA-3C zwiększa syntezę LMP-1 w niektórych nowotworach [1, 50]. Wykazano, że EBNA-3A i EBNA-3C tłumią transkrypcję aktywowaną przez RBP-J $\kappa$ -EBNA-2 poprzez zahamowanie wiązania RBP-J $\kappa$  do DNA. EBNA-3C i prawdopodobnie EBNA-3A mogą wspólnie z EBNA-2 odgrywać rolę jako aktywator genu LMP-1 [53]. Wskazuje to na istnienie sieci wzajemnych powiązań, którą, wpływając na siebie nawzajem, tworzą białka EBNA-3 i wszystkie czynniki transkrypcji EBNA [49].

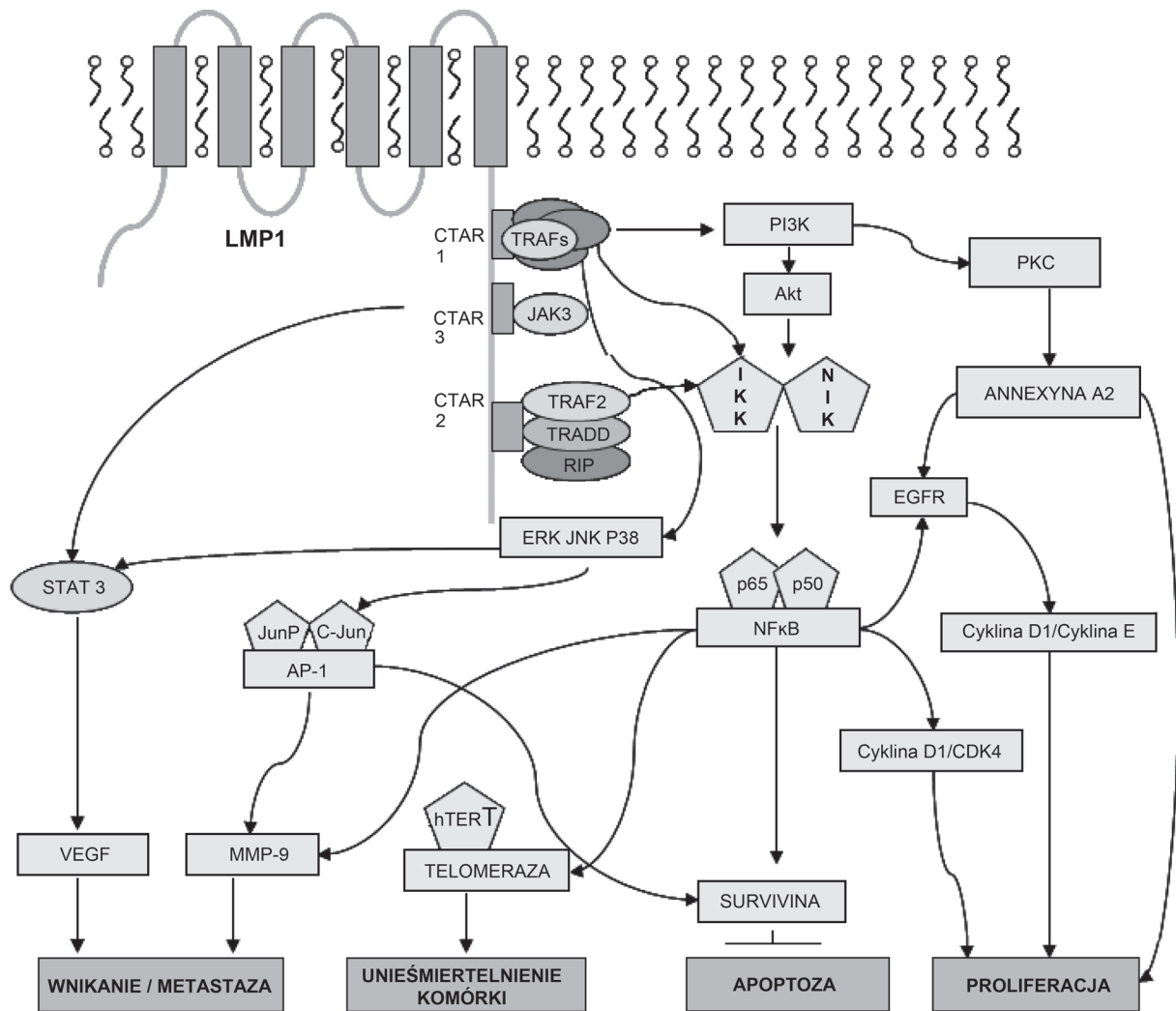
Białko LMP-1 jest integralnym białkiem błony plazmatycznej, o wielkości 62-kD, zbudowanym z trzech segmentów. W pierwszym segmencie krótki, cytoplazmatyczny N-koniec (24aa) jest odpowiedzialny za zorientowanie białka w błonie komórkowej i przyłączenie ubikwityny. Drugi segment z sześcioma hydrofobowymi domenami (161aa) ma zdolność oligomeryzacji cząsteczki LMP-1 i aktywacji małej GTPazy Cdc42 inicjującej reorganizację cytoszkieletu. Analiza mutacji dowiodła, że koniec -NH<sub>2</sub> i segment transmembranowy białka LMP-1 są odpowiedzialne za agregację błony, a ta agregacja jest kluczowa dla immortalizacji komórki [59]. LMP-1 tworzy w błonie plazmatycznej agregaty takie jak związane z ligandem receptory czynnika wzrostu [14]. W trzecim segmencie długi cytoplazmatyczny C-koniec (~200aa) dzieli się na trzy ważne regiony aktywujące – CTAR (C-terminal activating regions). Regiony te są miejscem przyłączenia i aktywacji swoistych białek komórkowych. CTAR1 i CTAR2, nazywane również miejscami transformacji efektorów, są niezbędne do transformacji limfocytów B. Końcowa domena -COOH białka LMP-1 wykazuje powinowactwo do TRAF-1 i TRAF-2 (TNF tumor necrosis factor receptor-associated factor-1 i -2) oraz TRADD (białko wzmacniające z powinowactwem do domeny śmierci receptora TNF $\alpha$ , TNF $\alpha$ -receptor associated death domain) [15, 17]. Miejsce transformacji efektorów-1 CTAR1 wiąże TRAF, a miejsce wiązania efektorów-2 CTAR2 wiąże TRADD [41, 88]. LMP-1 bierze udział w transformacji komórki przez połączenie z tymi samymi białkami

adaptorowymi związanymi z TRAFs, które łączą się z receptorem CD40. Naśladuje w ten sposób sygnały wzrostu komórkowego, które zwykle są wynikiem wiązania ligandu CD40 [26]. Wiązanie białek do LMP-1 indukuje kaskadę sygnałów, które wzmacniają żywotność i wzrost komórki. W chwili obecnej potwierdzona jest aktywacja przez LMP-1 siedmiu ścieżek przekazywania sygnałów. Na N-końcu LMP-1 następuje: ubikwitynizacja, aktywacja Cdc42, natomiast na C-końcu następuje aktywacja: NF $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) poprzez kinazę indukującą czynnik NF $\kappa$ B (NIK), czynnika aktywującego transkrypcję-2 (ATF-2) poprzez p38/aktywującą mitogen kinazę białkową (MAPK), czynników transdukcji i transkrypcji (STATs) poprzez kinazę Janusa (JAK) białka aktywatorowego 1 (AP-1) poprzez N-terminalną kinazę (JNK) oraz kinazy Akt poprzez kinazę fosfatidylinozytolu (PI3K) [78, 97]. Schemat działania tych ścieżek pokazano na rysunku 3.

Receptor dla TNF występuje w dwóch odmianach, każda z nich mobilizuje inny rodzaj białek adaptorowych i wywołuje przeciwstawny efekt komórkowy: apoptozę (receptor 55) lub proliferację (receptor 75). Poprzez wiązanie z białkami TRAF-1 i TRAF-2 połączonymi z fragmentami receptora p75 powoduje wewnątrzkomórkową aktywację antyapoptycznych czynników transkrypcyjnych; NF $\kappa$ B, AP-1 i STAT-1 a w następstwie proliferację zakażonych limfocytów B [64, 78].

Kaskada aktywacji ścieżek przekazywania sygnałów współdziałająca z LMP-1 prowadzi do wzmocnienia ekspresji cząstek adhezyjnych komórek B (LFA-1, CD54, CD58), wzmocnienia ekspresji markerów aktywacji komórek B (CD23, CD39, CD40, CD44 i HLA klasy II) i morfologicznych zmian takich jak aglutynacja (zlepianie komórek) [52]. Interakcje z LMP-1 powodują również nadekspresję białek BCL-2 i A20, które chronią zakażone komórki przed p53-zależną apoptozą [25, 92]. Ponadto uważa się, że LMP-1 jest powiązany z onkogenezą również przez zdolność wbudowywania i rearanżacji genów komórkowych.

LMP-2A i LMP-2B to dwa integralne z błoną komórkową białka hydrofobowe, kodowane przez gen LMP-2. Różnią się między sobą domeną N terminalną, zawierającą motyw aktywujący tyrozynozależny immunoreceptor. LMP-2A zawiera dodatkową domenę, kodowaną w egzonie 1, podczas gdy w białku LMP-2B egzon 1 jest niekodujący. Wykazano, że w komórkach epitelialnych ekspresja obu białek LMP-2 jest związana ze wzrostem zdolności tych komórek do rozprzestrzeniania się i migracji w matryksie międzykomórkowej [2, 71]. LMP-2A nie jest niezbędne w transformacji limfocytów B ale interferuje z ich receptorami sygnałowymi. Zebrane wyniki sugerują udział LMP-2A w utrzymaniu latencji i modyfikacji rozwoju komórek B [28, 62]. LMP-2A hamuje wewnętrzne wydzielanie interleukiny 6, co skutkuje negatywną regulacją ekspresji



Rys. 3. Schemat budowy LMP-1, wiązania białek i indukcji kaskady sygnałów wzmacniających żywotność i wzrost komórki

NFκB [64]. Stała ekspresja LMP-2A w chorobie Hodgkina i raku nosogardzieli wskazuje na ważną, aczkolwiek jeszcze nieznaną rolę w onkogenezie. Funkcja LMP-2B jest słabo poznana. Obecnie prowadzone badania sugerują, że może modulować aktywność LMP-2A [67].

## 7. Reaktywacja zakażenia latentnego

Reaktywacja wirusa i wejście w cykl lityczny może być spowodowane różnymi przyczynami, między innymi spadkiem odporności gospodarza. U pacjentów po zabiegu transplantacji leczenie immunosupresyjnie może być przyczyną rozwoju choroby limfoproliferacyjnej (PTLD).

Pierwszym białkiem cyklu litycznego jest białko Z, produkt genu BZLF-1 (nazywane również białkiem Zta lub ZEBRA) oraz białko R produkt genu BRLF-1. Oba białka autostymulują swoją własną ekspresję, wzajemnie się indukując i są niezbędne do wspólnej indukcji pełnego комплекtu wczesnych genów wirusa potrzebnych do litycznej replikacji EBV [23, 70, 82].

Białko Z jest aktywatorem transkrypcji wiążącym się do motywu AP-1-podobnego w promotorach wczesnych genów litycznych i indukującym cykl lityczny w komórkach zakażonych latentnie EBV [22]. Savard i wsp. wykazali, że w pierwotnej infekcji monocytów przez EBV, ekspresję transkryptu BZLF-1 można wykryć w dwie godziny po zakażeniu. Niektórzy autorzy donoszą, że białko Z może indukować ekspresję regulatorów cyklu komórkowego włącznie z p53 i wstrzymać cykl komórkowy [9, 18]. Przypuszczalnie zahamowanie funkcji p53 pozwala przeżyć komórkom podczas wczesnej fazy zakażenia EBV, co ma wpływ na stabilizację latencji. Ponadto stwierdzono, że ekspresja BZLF-1 we wczesnych pasażach limfoblastoidalnych linii komórkowych może prowadzić do tworzenia skupisk nowotworowych i rozpoczęcia ekspresji genów komórkowych [38]. Zatrzymanie cyklu komórkowego jest narzucane przez herpeswirusy podczas wirusowego litycznego cyklu replikacji DNA aby zapobiec konkurencji o wolne nukleotydy występujące w ograniczonej ilości z syntezą DNA komórki gospodarza i aby dostarczyć przestrzeni

nuklearnej dla wirusowego DNA [74]. Z tego punktu widzenia ekspresja BZLF-1 podczas latencji może być pozostałością z cyklu litycznego. W en i wsp. sugerują, że komórki, w których dochodzi do ekspresji BZLF-1 wchodzi w cykl lityczny i umierają, podczas gdy komórki, w których BZLF-1 nie ulega ekspresji są jedynymi, które przeżyły i ustabilizowały latencję [94].

We wczesnej fazie litycznej syntetyzowane są głównie białka odpowiedzialne za replikację wirusowego DNA. Białka fazy późnej cyklu litycznego modyfikują komórkę gospodarza, uczestniczą w budowie kapsydu i formowaniu nowopowstających wirionów oraz w zakażeniu kolejnych komórek gospodarza.

## 8. Wirusowe homologi białek komórkowych

Genom EBV koduje kilka ważnych białek będących sekwenyjnymi i funkcjonalnymi homologami różnych białek człowieka.

Białko BCRF-1 wykazuje 80% homologii do ludzkiej interleukiny 10 (IL-10). IL-10 posiada przede wszystkim zdolność do hamowania aktywacji i funkcji efektorowych limfocytów T, monocytów i makrofagów. Jest czynnikiem wzrostu i aktywacji dla limfocytów B. Odgrywa również rolę w ustaleniu latencji poprzez supresję systemu immunologicznego gospodarza [33, 89].

BDLF-2 to białko, które jest homologiem ludzkiej cykliny B1, która poprzez aktywację poszczególnych cyklinozależnych kinaz białkowych reguluje przejście z fazy G<sub>1</sub> w fazę M w cyklu komórkowym. Wciąż jeszcze mało wiadomo na temat proteiny BDLF-2. Jej obecność wykrywana była w przypadkach białaczki włochatokomórkowej, ale nie w innych chorobach charakteryzujących się zakażeniem latentnym. Sugeruje się, że jest to późny gen ulegający ekspresji w cyklu litycznym [31].

BARF-1 (nazywane również p29) jest wczesnym białkiem wykazującym homologię do wewnątrzkomórkowej cząsteczki adhezyjnej 1 jak również do receptora ludzkiego czynnika tworzenia kolonii co skutkuje zahamowaniem aktywności makrofagów [86]. Jest także zdolny do zahamowania wydzielania INF-alfa i immortalizacji pierwotnych komórek epitelialnych [24]. Ekspresję BARF-1 stwierdzono w biopsjach tkanek nowotworowych: z NPC i EBV-zależnych przypadkach raków żołądka, a także w chłoniaku z komórek B spotykanym w Malawi i nosowym chłoniaku z komórek NK/T. Dane te świadczą o udziale BARF-1 w procesach nowotworzenia. Ekspresja BARF-1 w linii komórkowej Louckes indukuje ekspresję protoonkogeny c-myc i B-komórkową aktywację antygenów CD21 i CD23 [65].

BHRF-1 komponent wczesnego antygeny (Early Antigen Complex) to białko wykazujące 25% homologii do ludzkiego onkogeny Bcl-2. Wykazano zdolność Bcl-2 i BHRF-1 do ochrony ludzkich limfocytów B przed

apoptozą [34]. Spektroskopowe oznaczenie struktury BHRF-1 wykazało jednak pewne różnice strukturalne sugerujące, że działanie mechanizmu antyapoptycznego jest w tym przypadku inne niż komórkowy mechanizm Bcl-x<sub>L</sub> lub Bcl-2 [39]. Uważa się, że BHRF-1 może przedłużać żywotność komórki dopuszczając do nagromadzenia się w niej mutacji onkogennych. Pozwala również na produkcję maksymalnej ilości wirionów podczas zahamowania apoptozy [66].

## 9. Właściwości onkogenne EBV

Do powstania nowotworu niezbędne są co najmniej dwa czynniki: zaburzenie przekazywania sygnałów i uniesmiertelnienie komórki. Wirusy onkogenne posiadają zdolność uniesmiertelniania komórki zakażonej, powodując jej niekontrolowaną proliferację i transformację nowotworową. Genom EBV koduje szereg białek, wykazujących homologię lub oddziałujących z wieloma cząsteczkami o charakterze antyapoptycznym, cytokinami i transduktorami sygnałów w komórce. Mogą dzięki temu promować zakażenie EBV, immortalizację i transformację zakażonej komórki [8].

Przyjmuje się, że aby wirus uznany został za czynnik etiologiczny nowotworu muszą zostać spełnione pewne warunki: musi istnieć związek epidemiologiczny pomiędzy występowaniem wirusa i nowotworu, musi zostać stwierdzona obecność antygeny lub genomu wirusa w komórkach nowotworu, wirus musi być izolowany z tkanki nowotworowej i być zdolny do transformacji komórek *in vitro*. Wirus Epsteina-Barr spełnia wszystkie wymienione wyżej warunki.

## 10. Nowotwory powiązane z zakażeniem EBV

Chłoniak Burkitta jest najwcześniej opisanym nowotworem. Jest on powiązany z zakażeniem EBV. Występuje w trzech postaciach – endemicznej, sporadycznej i u osób z HIV. DNA EBV jest wykrywane w ponad 95% przypadków endemicznych BL i 15–30% sporadycznych BL. Wśród osób zakażonych HIV, które rozwinęły BL obecność wirusa stwierdza się u 40–50% chorych [98].

W postaci endemicznej jako kofaktor BL wywołujący supresję limfocytów T wymienia się zakażenie zarodźcem malarii. Ostatnie badania dowodzą, że CIDR1α, białko produkowane przez *Plasmodium falciparum* może indukować cykl lityczny [12].

Bez względu na miejsce występowania i związek z EBV chłoniak Burkitta jest nieodmiennie związany ze swoistą translokacją chromosomalną długiego ramienia chromosomu 8 niosącego protoonkogen c-myc i jednego z *loci* ciężkiego lub lekkiego łańcucha immunoglobuliny na chromosom 14 (ciężki łańcuch), 2 lub



22 ( $\kappa$  lub  $\lambda$  lekki łańcuch). W konsekwencji powoduje to ciągłą ekspresję białka c-MYC, które stymuluje proces dojrzewania i proliferacji komórek oraz warunkuje przejście z fazy  $G_1$  do S cyklu komórkowego [91]. Translokacja ta powoduje również, że transkrypcji ulega wyłącznie białko EBNA-1, które jest nieimmunogenne dla limfocytów T. Wciąż jednak pozostaje wiele nie rozstrzygniętych kwestii dotyczących zależności występowania geograficznego, kofaktorów i etiologii EBV-negatywnych przypadków chłoniaka Burkitta [6].

Drugim nowotworem powiązanim z EBV jest występujący endemicznie rak jamy nosowo-gardłowej (NPC – nasopharyngeal carcinoma). W 1969 roku do badań NPC zastosowano test immunofluorescencyjny, którym wcześniej wykryto antygeny przeciwko EBV w komórkach chłoniaka Burkitta. Henle potwierdził wysoką reaktywność surowicy otrzymaną od chorego z NPC wobec antygeny przeciwko EBV [35]. Rok później zur Hausen potwierdził metodą hybrydyzacji obecność DNA EBV w komórkach raka jamy nosowo-gardłowej [99]. Obecnie według klasyfikacji WHO wyróżnia się trzy typy NPC: typ I – rak płaskonabłonkowy rogowaciejący (keratinising squamous-cell carcinoma), typ II – rak nierogowaciejący (non-keratinising carcinoma), typ III – rak niezróżnicowany (undifferentiated carcinoma). Z EBV powiązane są głównie typy II i III, natomiast w opublikowanych pracach dotyczących typu I znajdują się zarówno dane potwierdzające jak i nie potwierdzające obecności materiału genetycznego wirusa w komórkach nowotworu [29].

Najwięcej przypadków zachorowań na NPC odnotowuje się w południowo-wschodniej Azji: Chinach, Wietnamie i Filipinach, a także w Tunezji i na Alasce. Pierwotnie zakładano, że zwiększone ryzyko zachorowania na NPC w tym regionie może być związane ze spożywaniem konserwowanej żywności (szczególnie ryb), jednak późniejsze badania nie wykazały jednak wyższego poziomu nitrozoamin i bakterii mutagennych w badanych próbkach żywności. I to i wsp. stwierdzili, że występujące w oleju tungowym HHPA (Hexahydrophthalic Anhydride) aktywuje cykl lityczny EBV [29]. Stwierdzono także wpływ czynników genetycznych m.in. polimorfizmu genu TLR3 (Toll-like receptor 3) kodującego receptor, który odgrywa istotną rolę w zakażeniu EBV. [32]. Problem diety i wpływu środowiska w etiologii NPC jest cały czas przedmiotem intensywnych badań.

Ziarnica złośliwa (choroba Hodgkina) to grupa limfoidalnych rozrostów nowotworowych, morfologicznie wyróżniająca się występowaniem charakterystycznych olbrzymich komórek, nazywanych komórkami Reed-Stenberga [43]. W obecnej klasyfikacji wyróżnia się pięć postaci: chłoniak guzkowy Hodgkina z przewagą limfocytów (nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma) stanowi ok. 5% wszystkich przypadków HD, w komórkach guza nie stwierdza się materiału genetycz-

nego EBV; ziarnica typu NS (nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma) to około 65–75% przypadków HD, czasem stwierdza się wcześniejsze zakażenie EBV; ziarnica typu MC (mixed cellularity classical Hodgkin lymphoma) to około 20–25% HD w ponad 70% komórek RS wykrywa się genom EBV; ziarnica typu LD (lymphocyte depleted classical Hodgkin lymphoma) stanowi mniej niż 5% przypadków ziarnicy złośliwej, często wiąże się z zakażeniem EBV; klasyczna ziarnica bogata w limfocyty (lymphocyte-rich classical Hodgkin's disease) to dość rzadka postać ziarnicy, w około 40% stwierdza się zakażenie EBV [4, 11].

Poprzeszczepowa choroba limfoproliferacyjna (post-transplant lymphoproliferative disorder – PTLD) to heterogenna grupa chorób charakteryzująca się niekontrolowaną proliferacją z komórek układu chłonnego, najczęściej limfocytów B (90%) rzadziej limfocytów T (9%) lub komórek NK (0,5%). Najistotniejszym czynnikiem ryzyka rozwoju PTLD jest zakażenie EBV po transplantacji. Wzrasta ono u biorców EBV-seronegatywnych i waha się od 23% do 50%. Natomiast u biorców EBV-seropozytywnych wynosi od 0,7% do 1,9%. Zakażenie EBV może prowadzić do proliferacji komórek układu chłonnego niezależnie od rodzaju zakażenia (pierwotne czy reaktywacja) [45]. Przyczyną jest transformacja blastyczna komórek zakażonych EBV. Ze względu na różnice występujące w przebiegu i w obrazie klinicznym wyróżnia się wczesną i późną PTLD. W ujawniającej się przed upływem roku, wczesnej PTLD, znacznie częściej stwierdza się związek z zakażeniem EBV. Ostatnie badania nie potwierdziły skuteczności leków przeciwwirusowych w leczeniu PTLD. Bardziej celowe wydaje się ich zastosowanie w profilaktyce niż terapii rozpoznanej PTLD [42, 85].

Zakażenie EBV związane jest także w mniejszym lub większym stopniu z rozwojem nieziarnicznych chłoniaków nosowych z komórek T/NK w 90% przypadków i angioimmunoblastycznych 0–51% przypadków, raka żołądka lymphoepithelioma-like w około 90% i adenocarcinoma 5 do 25% przypadków [5]

W chorobie Duncana (zespół limfoproliferatywny uwarunkowany w chromosomie X) zakażenie EBV prowadzi do niekontrolowanego wzrostu populacji limfocytów T i komórek NK których aktywność skierowana jest przeciw nie zakażonym komórkom [72].

Zakażenie EBV jest czynnikiem etiologicznym różnych chłoniaków u osób z HIV/AIDS, zarówno układu limfoproliferacyjnego jak i centralnego układu nerwowego (30–90%) [10].

## 11. Podsumowanie

EBV jako przedstawiciel *Gammaherpesvirinae* posiada zdolność ustalania latencji w limfocytach B, wykorzystując receptor CD21. Podczas cyklu litycz-



nego, aktywowanego przez białko Z ekspresji ulegają geny odpowiadające za replikację wirusowego DNA, białka strukturalne kapsydu, tegumentu i umożliwiające fuzję z komórkami gospodarza. Genom wirusa koduje też białka będące strukturalnymi bądź funkcyjnymi homologami białek ludzkich. W wyniku ekspresji niektórych genów EBV w czasie cyklu latentnego syntetyzowanych jest sześć białek jądrowych (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C i -LP); trzy białka membranowe (LMP-1, -2A, -2B) oraz 2 małe fragmenty RNA (EBER-1 i -2). Białka te odpowiadają za otrzymywanie latencji, episomu, immortalizację komórek gospodarza i ich transformację blastyczną. W zależności od ekspresji tych genów wyróżniamy cztery typy latencji.

Zakażenie EBV szerzy się głównie drogą kropelkową. W większości przypadków zakażenie pierwotne ma miejsce w dzieciństwie i przebiega bezobjawowo, w okresie młodzieńczym może przyjmować postać mononukleozy. Obecność przeciwciał świadczy, że ponad 90% populacji osób dorosłych przeżyło zakażenie EBV.

Choć udział EBV w etiologii endemicznej postaci chłoniaka Burkitta i raka jamy nosowo-gardłowej potwierdzono już ponad 40 lat temu, obecnie wciąż prowadzi się badania nad wpływem tego wirusa na rozwój innych nowotworów. Wyniki nie są jednoznaczne i ciągle pojawiają się kolejne doniesienia potwierdzające lub wykluczające udział EBV w etiologii określonych chorób. Przedmiotem intensywnych badań jest również określenie udziału białek, zarówno latentnych jak i homologów białek ludzkich, w procesach transformacji nowotworowej: ścieżkach przekazywania sygnałów, w inicjowaniu i pobudzaniu podziału komórkowego (kontroli procesów wzrostu i różnicowania), regulacji cyklu komórkowego, ekspresji nowych receptorów powierzchniowych i zmianie budowy cząsteczek adhezyjnych. Badania nad ekspresją białek pozwolą określić które ścieżki przekazywania sygnałów w komórce gospodarza mogą ulec zaburzeniom. Określenie etapu na którym następują zaburzenia powodujące uniesmiertelnienie lub proliferację komórki jest niezwykle istotne w przypadku poszukiwania skutecznych terapii przeciwnowotworowych.

## Piśmiennictwo

- Allday M.J., Farrell P.J.: Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA3C/6 expression maintains the level of latent membrane protein 1 in G<sub>1</sub>-arrested cells. *J. Virol.* **68**, 3491–3498 (1994)
- Allen M.D., Young L.S., Dawson C.W.: The Epstein-Barr virus-encoded LMP2A and LMP2B proteins promote epithelial cell spreading and motility. *J. Virol.* **79**, 1789–1802 (2005). Erratum in: *J. Virol.* **79**, 3889 (2005)
- Altmann M., Pich D., Ruiss R., Wang J., Sugden B., Hamerschmidt W.: Transcriptional activation by EBV nuclear antigen 1 is essential for the expression of EBV's transforming genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 14188–14193 (2006)
- Andersson J.: Epstein-Barr virus and Hodgkin's lymphoma. *Herpes*. **13**, 12–16 (2006)
- Aozasa K., Zaki M.A.: Epidemiology and pathogenesis of nasal NK/T-cell lymphoma: a mini-review. *Scientific World Journal*. **11**, 422–428 (2011)
- Bornkamm G.W.: Epstein-Barr virus and the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: more questions than answers. *Int. J. Cancer*, **124**, 1745–1755 (2009)
- Burkitt D., Wright D.H.: A Lymphoma syndrome in tropical Africa with a note on histology, cytology and histochemistry. *Int. Rev. Exp. Pathol.* **2**, 67–138 (1963)
- Carbone A., Gloghini A., Dotti P.: EBV-associated lymphoproliferative disorders classification and treatment. *Oncologist*, **13**, 577–585 (2008)
- Cayrol Y.N., Flemington E.K.: The Epstein-Barr virus bZIP transcription factor Zta causes G0/G1 cell cycle arrest through induction of cyclin-dependent kinase inhibitors. *EMBO J.* **15**, 2748–2759 (1996)
- Cesarman E.: Gammaherpesvirus and lymphoproliferative disorders in immunocompromised patients. *Cancer Lett.* **305**, 163–174 (2011)
- Chen M.R.: Epstein-Barr virus, the immune system, and associated diseases. *Front Microbiol.* **2**, 1–5 (2011)
- Chene A., Donati D., Guerreiro-Cacais A.O., Levitsky V., Chen Q., Falk K.I., Orem J., Kironde F., Wahigren M., Bejarano M.T.: A molecular link between malaria and Epstein-Barr virus reactivation. *PLoS Pathog.* **3**, 826–834 (2007)
- Chesnokova L.S., Nishimura S.L., Hutt-Fletcher L.M.: Fusion of epithelial cells by Epstein-Barr virus proteins is triggered by binding of viral glycoproteins gHgL to integrins alphavbeta6 or alphavbeta8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 20464–20469 (2009)
- Clausse B., Fizazi K., Walczak V., Tetaud C., Wiels J., Tursz T. i wsp.: High concentration of the EBV latent membrane protein 1 in glycosphingolipid-rich complexes from both epithelial and lymphoid cells. *Virology*, **228**, 285–293 (1997)
- Coffin W.F. 3<sup>rd</sup>, Erickson K.D., Hoedt-Miller M., Martin J.M.: The cytoplasmic amino-terminus of the latent membrane protein-1 of Epstein-Barr virus: relationship between transmembrane orientation and effector functions of the carboxyterminus and transmembrane domain. *Oncogene*, **20**, 5313–5330 (2001)
- Collier L., Oxford J.: Wirus Epstein-Barr. w: *Wirusologia Lekarska*. Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, 2001, s. 245–253.
- Devergne O., Hatzivassiliou E., Izumi K., Kaye K.M., Kleijnen M.F., Kieff E. i wsp.: Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF- $\kappa$ B activation. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 7098–7108 (1996)
- Dreyfus D.H., Nagasawa M., Kelleher C.A., Gelfand E.W.: Stable expression of Epstein-Barr virus BZLF-1 encoded ZEBRA protein activates p53-dependent transcription in human Jurkat T-lymphomablastoid cells. *Blood*, **96**, 625–634 (2000)
- Ebell M.H.: Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *Am. Fam. Physician.* **70**, 1279–1287 (2004)
- Epstein M.A., Achong B., Barr Y.M.: Virus particles in cultured lymphoblast from Burkitt's lymphoma. *Lancet*, **1**, 702–703 (1964)
- Epstein M.A., Achong B.G., Barr Y.M.: Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt lymphoma. *J. Exp. Med.* **121**, 761–770 (1965)
- Farrell P.J., Rowe D.T., Rooney C.M., Kouzarides T.: Epstein-Barr virus BZLF1 trans-activator specifically binds to a consensus AP-1 site and related to c-fos. *EMBO J.* **8**, 127–132 (1989)
- Feederle R., Kost M., Baumann M., Janz A., Drouet E., Hamerschmidt W., Delecluse H.J.: The Epstein-Barr virus lytic

- program is controlled by the co-operative functions of two transactivators. *EMBO J.* **19**, 3080–3089 (2000)
24. Fiorini S., Ooka T.: Secretion of Epstein-Barr virus-encoded BARF1 oncoprotein from latently infected B cells. *Viol. J.* **5**, 70–74 (2008)
  25. Fries K., Miller W., Raab-Traub N.: Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 blocks p53-mediated apoptosis through the induction of the A20 gene. *J. Virol.* **70**, 8653–8659 (1996)
  26. Gires O., Zimmer-Strobl W., Pich D., Ueffing M., Marschall G., Ziedler R. i wsp. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics constitutively active receptor molecule. *EMBO J.* **16**, 6131–6140 (1997)
  27. Gorzer I., Niesters H.G., Cornelissen J.J., Puchhammer-Stockl E.: Characterization of Epstein-Barr virus Type 1 variants based on linked polymorphism among EBNA-3A, -3B, and -3C genes. *Virus Res.* **118**, 105–114 (2006)
  28. Gradoville L., Kwa D., El-Guindy A., Miller G.: Protein kinase c-independent activation of the Epstein-Barr virus lytic cycle. *J. Virol.* **76**, 5612–5626 (2002)
  29. Gullo C., Low W.K., Teoh G.: Association of Epstein-Barr virus with nasopharyngeal carcinoma and current status of development of cancer-derived cell lines. *Ann. Acad. Med. Singapore.* **37**, 769–77 (2008)
  30. Hardie D.R.: Human  $\gamma$ -herpesviruses: A review of 2 divergent paths to oncogenesis. *Transfus. Apher. Sci.* **42**, 177–183 (2010)
  31. Hayes D.P., Brink A.A.T.P., Vervoot M.B.H.J., Middeldorp J.M., Meijer C.J., van der Brule A.J.: Expression of Epstein-Barr virus (EBV) transcript encoding homologues to important human proteins in diverse EBV associated diseases. *Mol. Pathol.* **52**, 97–103 (1999)
  32. He J.F., Jia W.H., Fan Q., Zhou X.X., Qin H.D., Shugart Y.Y., Zeng Y.X.: Genetic polymorphisms of TLR3 are associated with Nasopharyngeal carcinoma risk in Cantonese population. *BMC Cancer.* **7**, 194–201 (2007)
  33. Helminen M., Lahdenpohja N., Hurme M.: Polymorphism of the IL-10 gene is associated with susceptibility to Epstein-Barr virus infection. *J. Infect. Dis.* **180**, 496–499 (1999)
  34. Henderson S., Huen D., Rowe M., Dawson C., Johnson G., Ickinson A.: Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 8479–8483 (1993)
  35. Henle G., Henle W.: Seroepidemiology of the virus. w: M.A. Epstein B.G. Achong (eds). The Epstein-Barr virus. 297–320. Berlin: Springer-Verlag, 1979.
  36. Henle G., Henle W., Diehl V.: Relation of Burkitt's tumor associated herpes type virus to infection mononucleosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **59**, 94–101 (1968)
  37. Heslop E.H.: How I treat EBV lymphoproliferation. *Blood.* **114**, 4002–4008 (2009)
  38. Hong G.K., Kumar P., Wang L., Damania B., Gulley L., Delecluse H.J., Polverini P.J., Kenney S.C.: Epstein-Barr virus lytic infection is required for efficient production of the angiogenesis factory vascular endothelial growth factor in lymphoblastoid cell lines. *J. Virol.* **79**, 13984–13992 (2005)
  39. Huang Q., Petros A., Wirgin H., Fesik S., Olejniczak W.: Solution structure of the BHRF-1 protein from Epstein-Barr virus, a homologue of human Bcl-2. *J. Mol. Biol.* **332**, 1123–1130 (2003)
  40. Hutt-Fletcher L.M.: Epstein-Barr virus entry. *J. Virol.* **81**, 7825–7832 (2007)
  41. Izumi K., Kieff E.: The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and NF- $\kappa$ B activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 12592–12597 (1997)
  42. Kalinova L., Indrakova J., Bachleda P.: Post-transplant lymphoproliferative disorder. *Biomed Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* **153**, 251–257 (2009)
  43. Kapatai G., Murray P.: Contribution of the Epstein Barr virus to the molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. *J. Clin. Pathol.* **60**, 1342–1349 (2007)
  44. Karlin S., Blaisdell B., Schachtel G.: Contrast in codon usage of latent versus productive genes of Epstein-Barr virus: data and hypotheses. *J. Virol.* **64**, 4264–4273 (1990)
  45. Karst J., Konopka L.: Poprzeszczepowa choroba limfoproliferacyjna. *Onkol. Pol.* **8**, 209–216 (2005)
  46. Kennedy G., Sugden B.: EBNA-1, a bifunctional transcriptional activator. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 6901–6908 (2003)
  47. Kieff E. Epstein-Barr virus and its replication. In: Fields B.N., Knipe P.M., Howley et al. (eds.) Fields Virology, Ed. 4, vol. 2, Lippincott-Raven Publ. Philadelphia, 2007.
  48. Kirschner A., Omerovic J., Popov B., Longnecker R., Jar-detzky T.: Soluble Epstein-Barr virus glycoproteins gH, gL and gp2 form a 1:1:1 stable complex that acts like soluble gp42 in B-cell fusion but not epithelial cell fusion. *J. Virol.* **80**, 9444–9454 (2006)
  49. Klein G., Klein E., Kashuba E.: Interaction of Epstein-Barr virus (EBV) with human B-lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396**, 67–73 (2010)
  50. Knight J.S., Lan K., Subramanian C., Robertson E.S.: Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C recruits histone deacetylase activity and associates with the corepressors mSin3A and NCoR in human B-cell lines. *J. Virol.* **77**, 4261–4272 (2003)
  51. Lee M., Diamond M., Yates J.: Genetic evidence that EBNA-1 is needed to efficient stable infection by Epstein-Barr virus. *J. Virol.* **73**, 2974–2982 (1999)
  52. Li H.P., Chang Y.S.: Epstein-Barr virus latent membrane protein 1: structure and functions. *J. Biomed. Sci.* **10**, 490–504 (2003)
  53. Lin J., Johannsen E., Robertson E., Kieff E.: Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C putative repression domain mediates coactivation of the LMP1 promoter with EBNA-2. *J. Virol.* **76**, 2332–2342 (2002)
  54. Ling P.D., Tan J. Peng R.S.: Nuclear-cytoplasmic shuttling is not required for the Epstein-Barr Virus EBNA-LP transcriptional coactivation function. *J. Virol.* (2009) **85**(14), 7109–7116.
  55. Lucchesi W., Brady G., Dittrich-Breiholz, Kracht M., Russ R., Farrel P.J.: Differential gene regulation by Epstein-Barr virus type 1 and type2 EBNA2. *J. Virol.* **82**, 7456–7466 (2008)
  56. Matsuda G., Nakajima K., Kawaguchi Y., Yamanashi Y., Hirai K.: Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen protein (EBNA-LP) forms complexes with a cellular anti-apoptosis protein Bcl-2 or its EBV counterpart BHRF1 through HS1-associated protein X-1. *Microbiol. Immunol.* **4**, 91–99 (2003)
  57. Middleton T., Sugden B.: Retention of plasmid DNA in mammalian cells enhanced by binding of the Epstein-Barr virus replication protein EBNA-1. *J. Virol.* **68**, 4067–4071 (1994)
  58. Miller G.: Book Review, Epstein-Barr Virus. *New Engl. J. Medicine*, **355**, 2708–2709 (2006)
  59. Moorthy R., Thorley-Lawson D.: Biochemical, genetic and functional analyses of the phosphorylation sites on the Epstein-Barr virus encoded oncogenic latent membrane protein LMP-1. *J. Virol.* **67**, 2637–2645 (1993)
  60. Münz C., Moormann A.: Immune escape by Epstein-Barr virus associated malignancies. *Semin. Cancer Biol.* **18**, 381–387 (2008)
  61. Münz C.: Epstein-barr virus nuclear antigen 1: from immunologically invisible to a promising T cell target. *J. Exp. Med.* **199**, 1301–1304 (2004)
  62. Murray P.G., Young L.S.: The role of the Epstein-Barr virus in human disease. *Front. Biosci.* **7**, 519–540 (2002)

63. Nonoyama M., Kawai Y., Pagano J.S.: Detection of Epstein-Barr virus DNA in human tumors. *Bibl. Haematol.* **40**, 577–583 (1975)
64. Oliveira D.E., Ballon G., Cesarman E.: NF-kappaB signaling modulation by EBV and KSHV. *Trends Microbiol.* **18**, 248–257 (2010)
65. Ooka T.: BARP1 gene as an EBV encoded oncogene. *EBV Rep.* **8**, 177–182 (2001)
66. Oudejans J.J., van de Brule A.J.C., Jiwa N.M. Bruin P.: BHRF1, the Epstein-Barr virus (EBV) homologue of the bcl-2 (proto-) oncogene, is transcribed in EBV associated B-cell lymphomas and in reactive lymphocytes. *Blood*, **86**, 1893–1902 (1995)
67. Pang M.E., Lin K.W., Peh S.C.: The signaling pathways of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 2A (LMP2A) in latency and cancer. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **14**, 222–247 (2009)
68. Pope J.I.I., Horne M.K., Scott W.: Transformation of fetal human leukocytes *in vitro* by filtrates of human leukemic cell line containing herpes like virus. *Int. J. Cancer.* **3**, 857–866 (1968)
69. Radkov S.A., Bain M., Farrell P.J., West M., Rowe M., All-day M.J.: Epstein-Barr virus EBNA3C represses Cp, the major promoter for EBNA expression, but has no effect on the promoter of the cell gene CD21. *J. Virol.* **71**, 8552–8562 (1997)
70. Ragoczy T., Miller G.: Role of the Epstein-Barr virus RTA protein in activation of distinct classes of viral lytic cycle genes. *J. Virol.* **73**, 9858–9866 (1999)
71. Rechsteiner M.P., Bernasconi M., Berger C., Nadal D.: Role of latent membrane protein 2 isoforms in Epstein-Barr virus latency. *Trends Microbiol.* **16**, 520–527 (2008)
72. Rezaei N., Mahmoudi E., Aghamohammadi A., Das R., Nichols K.E.: X-linked lymphoproliferative syndrome: a genetic condition typified by the triad of infection, immunodeficiency and lymphoma. *Br. J. Haematol.* **152**, 13–30 (2011)
73. Rickinson A.B., Kieff E.: Epstein-Barr Virus. w: Fields B.N., Knipe P.M., Howley et al. (eds.) *Fields Virology*, ed. 4, vol. 2, Lippincott-Raven Publ. Philadelphia, 2007.
74. Roizman B., Knipe D.M.: Herpes simplex viruses and their replication. In: M. Knipe, P.M. Howley (eds), *Fields virology*, 4<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001.
75. Rooney C., Howe J.G., Speck S.H., Miller G.: Influences of Burkitt's lymphoma and primary b-cells on latent gene expression by the nonimmortalizing P3J-HR-1 strain of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* **63**, 1531 (1989)
76. Rowe D.: Epstein-Barr virus immortalization and latency. *Front. Biosci.* **4**, 346–371 (1999)
77. Rowe D., Clarke J.: The type-specific epitopes of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 are near the carboxy terminus of the protein. *J. Gen. Virol.* **70**, 1217–1229 (1989)
78. Shair K.H.Y., Bendt K.M., Edwards R.H., Bedford E.C., Nielsen J.N. Raab-Traub N.: EBV latent membrane protein 1 activates Akt, NFkB, and Stat3 in B cell Lymphomas. *PLoS. Pathog.* **3**, 1669–1683 (2007)
79. Sherif A., Rezk M.D., Lawrence M., Weiss M.D.: Epstein-Barr virus associated lymphoproliferative disorders. *Hum. Pathol.* **38**, 1293–1304 (2007)
80. Shope T., Decchiano D., Miller G.: Malignant lymphoma in cottontop marmosets after inoculation with Epstein-Barr virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 2487–2491 (1973)
81. Rickinson A.B., Kieff E.: Epstein-Barr virus. In: Fields B.N., Knipe P.M., Howley et al. (eds.) *Fields Virology*, Ed. 4, vol. 2, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 2007.
82. Sinclair A.J., Brimmell M., Shanahan F., Farrell P.J.: Pathways of activation of the Epstein-Barr virus productive cycle. *J. Virol.* **65**, 2237–2244 (1991)
83. Sinclair A., Palermo I., Peters G., Farrell P.: EBNA-2 and EBNA-LP cooperate to cause G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> transition during immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *EMBO J.* **13**, 3321–3328 (1994)
84. Snopok B., Yurchenko M., Szekely L., Klein G., Kashuba E.: SPR-based immunocapture approach to creating an interfacial sensing architecture: Mapping of the MRS18–2 binding site on retinoblastoma protein. *Anal. Bioanal. Chem.* **386**, 2063–2073 (2006)
85. Stojanova J., Caillard S., Rousseau A., Marquet P.: Post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD): Pharmacological, virological and other determinants. *Pharmacol. Res.* **63**, 1–7 (2011)
86. Strockbine L.D., Cohen J.I., Farrah T., Lyman S.D., Wagener F., DuBose R.F. i wsp. The Epstein-Barr virus BARP1 gene encodes a novel, soluble colony-stimulatingfactor-1 receptor. *J. Virol.* **72**, 4014–4021 (1998)
87. Sugden B.: Latent infection of B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *Sem. Virol.* **5**, 197–205 (1994)
88. Thompson M.P., Aggarwal B.B., Shishoda S., Estrov Z. Kurzrock R.: Autocrine lymphotoxin production in Epstein-Barr virus (EBV)-immortalized B-cells: induction via NF-κB activation mediated by EBV-derived latent membrane protein 1. *Leukemia (Baltimore)*, **17**, 2196–2201 ((2003)
89. Thompson M.P., Kurzrock R.: Epstein-Barr Virus and cancer. *Clin. Cancer Res.* **10**, 803–821 (2004)
90. Tiwawech D., Srivatanakul P., Karalak A., Ishida T.: Association between EBNA2 and LMP1 subtypes of Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma in Thais. *J. Clin. Virol.* **42**, 1–6 (2008)
91. Vereide D., Sugden B.: Proof for EBV's sustaining role in Burkitt's lymphomas. *Semin. Cancer Biol.* **19**, 389–393 (2009)
92. Wang S., Rowe M., Lundgren E.: Expression of the Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 causes a rapid and transient stimulation of the Bcl-2 homologue Mcl-1 levels in B-cell lines. *Cancer Res.* **56**, 4610–4613 (1996)
93. Weigel R. Fischer D.K., Heston L., Miller G. Constitutive expression of Epstein-Barr virus-encoded RNAs and nuclear antigen during latency and after induction of Epstein-Barr replication. *J. Virol.* 1985) **53**, 254–259.
94. Wen W., Iwakiri D., Yamamoto K., Maruo S., Kanda T., Takada K.: Epstein-Barr virus BZLF-1 gene, a switch from latency to lytic infection, is expressed as an immediate-early gene after primary infection of B lymphocytes. *J. Virol.* **81**, 1037–1042 (2007)
95. Wensing B., Farrell P.J.: Regulation of cell growth and death by Epstein-Barr virus. *Microbes Infect.* **2**, 77–84 (2000).
96. Wu H.C., Lu T.Y., Lee J.J., Hwang J.K., Lin Y.J., Wang C.K., Lin C.T.: MDM2 expression in EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells. *Lab. Invest.* **84**, 1547–1556 (2004)
97. Zheng H., Li L., Hu D., Deng X., Cao Y.: Role of Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 in the carcinogenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Cell. Mol. Immunol.* **4**, 185–196 (2007)
98. Zur Hausen H.: The early days of Epstein-Barr Virus research: the Henle years. In: Robertson, Earl S.. *Epstein-Barr Virus*. Trowbridge: Cromwell Press. s. 15–22. 2006
99. Zur Hausen H., Schulte-Holthausen H., Klein G., Henle W., Henle G., Clifford P., Santesson L.: EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature*, **228**, 1056–1058 (1970)