

Received: 2011.02.04
Accepted: 2011.04.21
Published: 2011.05.16

Zakażenia EBV – cykl życiowy, metody diagnostyki, chorobotwórczość

Epstein-Barr virus infection – life cycle, methods of diagnosis, associated diseases

Joanna Bocian¹, Danuta Januszkiewicz-Lewandowska^{2,3,4}

¹ Zakład Diagnostyki Medycznej

² Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

³ Zakład Diagnostyki Medycznej w Poznaniu

⁴ Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego Klinika Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej w Poznaniu

Streszczenie

Wirus Epsteina-Barr (EBV) jest szeroko rozpowszechniony na całym świecie. Szacuje się, że około 90–95% populacji dorosłych przeszło infekcję tym patogenem. EBV jest przede wszystkim czynnikiem etiologicznym mononukleozy zakaźnej. Potwierdzono także związek przebytej infekcji EBV z rozwojem endemicznej postaci chłoniaka Burkitta. Przyjmuje się również, że EBV przyczynia się do występowania najpowszechniejszego powikłania u pacjentów po transplantacjach, jakim jest poprzyszczepowa choroba limfoproliferacyjna. Dużą zależność stwierdza się między przebyłą infekcją EBV a rozwojem chłoniaka Hodgkina, raka nosogardzieli i żołądka oraz nowotworów wywodzących się z mięśni gładkich. Podejrzewa się również związek przebytej infekcji z rozwojem niektórych chorób autoimmunologicznych i alergicznych. Wirus Epsteina-Barr jest wirusem z rodziny *Herpesviridae*, zawierającym materiał genetyczny w postaci dsDNA. Wyróżnia się dwa typy wirusa Epsteina-Barr: typ A i B. Jedynym naturalnym gospodarzem dla EBV jest człowiek, a docelowymi komórkami dla EBV są głównie limfocyty B oraz komórki epitelialne nosogardzieli. Cykl życiowy EBV dzieli się na fazę lityczną oraz latentną. W fazie latentnej wyróżnia się trzy różne wzory ekspresji poszczególnych białek wirusowych. W pewnych warunkach może dojść do reaktywacji EBV, co ma znaczenie głównie w transplantologii. Podstawowe metody diagnostyki zakażeń EBV to metody serologiczne polegające na detekcji odpowiednich przeciwciał. Ostatnio coraz większe znaczenie mają też metody biologii molekularnej, tj. PCR czy hybrydyzacja *in situ*.

Słowa kluczowe:

wirus Epsteina-Barr • genom • białka wirusowe • nowotwory związane z EBV • diagnostyka

Summary

Epstein-Barr virus (EBV) is a ubiquitous virus that infects about 90–95% of the adult population. EBV establishes life-long latent persistence. The virus is found to be the major cause of infectious mononucleosis but it has also been associated with development of endemic Burkitt's lymphoma. Result of EBV infection is the most common complication in patients after transplantation which is a post-transplant lymphoproliferative disease. Strong associations between EBV infection and Hodgkin's lymphoma, nasopharyngeal carcinoma, gastric carcinoma and carcinomas derived from smooth muscle tissue also exist. There is a hypothesis that there is an association between EBV infection and autoimmune and allergic diseases. EBV is a Herpesvirus family member; its genetic material has dsDNA form. There are two strains of EBV: A and B. The

only host for EBV is human with target cells: B cells and epithelial cells. The life cycle of EBV consists of lytic and latent phases. In the latent phase three different patterns of gene expression are possible. Due to some circumstances EBV can undergo reactivation, which is an important issue in transplantology. The main methods of diagnosis of EBV infections are serological methods that detect certain specific antibodies and recently more popular molecular biological methods such as PCR or *in situ* hybridization.

Key words: Epstein-Barr virus • genome • viral proteins • EBV-associated neoplasms • diagnosis

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=943104>

Word count: 7398

Tables: 3

Figures: –

References: 24

Adres autorki: wolontariuszka Joanna Bocian, Zakład Diagnostyki Medycznej, ul. Dobra 38, 60-595 Poznań;
e-mail: asiabocian@wp.pl

WPROWADZENIE

W ostatnich latach zainteresowanie wirusem Epsteina-Barr (EBV) znacznie wzrosło. Wiąże się to z doniesieniami o potencjalnym działaniu onkogennym tego wirusa [2,4,7,16]. EBV jest szeroko rozpowszechniony na całym świecie. Szacuje się, że 90–95% populacji dorosłych przeszło infekcję tym patogenem, niezależnie od miejsca zamieszkania czy statusu ekonomicznego [1,2,4,14,16]. Do zakażenia dochodzi zazwyczaj w okresie przedszkolno-szkolnym, a choroba ma najczęściej przebieg bezobjawowy, samoograniczający [15]. Jednak osoba raz zarażona przez całe życie posiada limfocyty B zawierające DNA wirusa EBV [1,4,5]. Wynika to z tropizmu EBV do limfocytów B oraz zdolności wirusa do przechodzenia w cykl latentny. W pewnych warunkach EBV może jednak ulec reaktywacji. Wirus EBV jest przede wszystkim czynnikiem etiologicznym mononukleozy zakaźnej, ale wykazano również zależność między zakażeniem EBV a występowaniem licznych chorób rozrostowych. Potwierdzono związek przebytej infekcji EBV z rozwojem endemicznej postaci chłoniaka Burkitta [20,23]. Przyjmuje się również, że EBV przyczynia się do występowania najpowszechniejszego powikłania u pacjentów po transplantacjach, jakim jest poprzeczowa choroba limfoproliferacyjna [10]. Wykazano związek między przebytą infekcją EBV a rozwojem chłoniaka Hodgkina, raka nosogardzieli, raka żołądka oraz nowotworów wywodzących się z mięśni gładkich. Podejrzewa się również związek przebytej infekcji z rozwojem niektórych chorób autoimmunologicznych i alergicznych. Mimo licznych badań prowadzonych nad EBV, dokładne mechanizmy dotyczące procesu infekowania komórek docelowych, namnażania wirusa, przechodzenia w stan uśpienia czy indukcji transformacji nowotworowej przez wirusa pozostają niewyjaśnione [4].

RYS HISTORYCZNY I CHARAKTERYSTYKA EBV

Michael Anthony Epstein i Yvonne Barr w 1964 r. za pomocą mikroskopu elektronowego w hodowli tkankowej z biopsji wykonanej u pacjenta z chłoniakiem Burkitta odkryli cząstkę zakaźną, biologicznie i antygenowo podobną

do herpeswirusów [1,2,4,20]. Jednak historia wiedzy związanej z wirusem i chorobami, które wywołuje sięga końca XIX wieku, kiedy to Filatov i Pfeiffer opisali chorobę charakteryzującą się złym samopoczuciem, gorączką, hepatosplenomegalią oraz limfadenopatią. Chorobę nazwali gorączką gruczołową (*glandular fever*) [8]. W 1921 r. Sprunt i Evans zaobserwowali leukocytozę z komórkami mononuklearnymi u młodych ludzi cierpiących na identyczny zespół objawów. W 1925 r. Davidsohn zauważył aglutynację owczych i końskich erytrocytów zachodzącą pod wpływem przeciwciał obecnych w surowicy chorych na mononukleozę zakaźną. Wysilek Davidsohna oraz Paula i Bunnella doprowadził do opracowania testu szkiełkowego nazwanego testem PBD (test Paula-Bunnella-Davidsohna) [2]. W 1958 r. brytyjski chirurg Denis Burkitt opisał występującego endemicznie w Afryce równikowej szczególnego chłoniaka z predylekcją do głowy i szyi. Już wtedy podejrzewał, że czynnikiem etiologicznym tego schorzenia jest wirus [1,20]. Chociaż w 1964 r. wirus został odkryty, dopiero w 1968 r. Henle potwierdził zależność między EBV a mononukleozą zakaźną na podstawie analizy surowicy jednego ze swoich współpracowników, który chorował na tę chorobę.

Wirus Epsteina-Barr jest wirusem z rodziny *Herpesviridae*, do której należą również inne wirusy infekujące człowieka wśród nich m.in. *Herpes simplex* (wirus opryszczki pospolitej), *Varicella zoster* (wirus ospy wietrznej i półpaśca), *Cytomegalovirus* (wirus cytomegalii) i inne. Mimo powszechności wirusów rodziny *Herpesviridae* w przyrodzie, jedynym naturalnym gospodarzem EBV jest człowiek. Eksperymentalnie udało się jednak zainfekować nim pewne gatunki małp, a nawet wyindukować u nich chłoniaki EBV-zależne [20]. EBV, który według taksonomii wirusologicznej jest ludzkim herpeswirusem typu 4 (human herpesvirus 4 – HHV-4) należy do podrodziny *Gammaherpesvirinae*, zaliczany jest do grupy *Lymphocryptovirus* [1,15]. Tak jak u wszystkich przedstawicieli *Herpesviridae*, EBV ma kapsyd o symetrii ikosaedralnej. Kapsyd zbudowany jest ze 162 kapsomerów i otacza materiał genetyczny wirusa, którym jest podwójna nić DNA o strukturze liniowej [20]. Wiriony EBV otacza tegument (warstwa białkowa)

i osłonka pochodząca z błony komórkowej gospodarza. Osłonka ma postać dwuwarstwy lipidowej zawierającej glikoproteiny wystające na zewnątrz osłonki. Rozmiar kapsydu EBV mieści się w przedziale 100–110 nm, natomiast cały wirion dzięki osłonce zyskuje kształt zbliżony do kuli o rozmiarze 120–200 nm.

GENOM, BIAŁKA ORAZ CYKL ŻYCIOWY EBV

Genom wirusa Epsteina-Barr to podwójna nić DNA (dsDNA) o strukturze liniowej, składająca się z około 172 tysięcy par zasad (pz) [2,15,16]. Genom ten zawiera prawie 100 otwartych ramek odczytu (open reading frame – ORF) i koduje 100–200 polipeptydów [2,15]. EBV zawiera serie terminalnych sekwencji powtórzonych (terminal direct repeats – TRs) wielkości 500 pz występujących na obu końcach genomu wirusa oraz sekwencje wewnętrznie powtórzone (internal repeat sequence IRs), które dzielą genom na domeny US i UL (short/long unique sequence domain). EBV był pierwszym herpeswirusem, którego cały genom został sklonowany i poddany sekwencjonowaniu. Fragmenty genomu odpowiadające otwartym ramkom odczytu przypisane są konkretnym odcinkom mapy restrykcyjnej stworzonej na podstawie trawienia genomu endonukleazą BamH1. Odcinki te uporządkowano według ich malejących rozmiarów przypisując im litery od A do Z [20,23]. DNA EBV może przybierać dwie postaci: postać liniową (podczas fazy litycznej infekcji) lub episomalną (postać kolista w stanach latencji) [16]. Do tej pory wyodrębniono dwa typy wirusa Epsteina-Barr: typ A oraz typ B (odpowiednio EBV1 i EBV2), które genetycznie różnią się nieznacznie (główna różnica dotyczy sekwencji genu antygeny jądrowego EBNA-2) [1]. Bardziej znaczące różnice między tymi dwoma typami dotyczą lokalizacji geograficznej. Typ A jest typem częściej występującym na świecie. W krajach Europy Zachodniej powoduje prawie 90% wszystkich zakażeń EBV [16]. Natomiast typ B, to typ dominujący w rejonach Afryki równikowej. W połowie przypadków endemicznego chłoniaka Burkitta stwierdza się obecność EBV-2, natomiast w 85% raków nosogardzieli na Tajwanie wykrywa się EBV-1 [20]. Prawdopodobnie typ A skutecznie wywołuje immortalizację limfocytów B, ale dotychczas nie udowodniono, by któryś z tych typów był bardziej onkogenny. Zarówno jeden jak i drugi typ mogą współistnieć u tej samej osoby [1,2,5]. EBV to wirus, którego docelowymi komórkami są głównie limfocyty B oraz komórki epitelialne nosogardzieli. Rzadko replikacja genomu i ekspresja białek wirusa zachodzi w innych komórkach, np. limfocytach T lub komórkach NK. Limfocyty B to komórki stosunkowo długo żyjące, przez co stanowią idealne miejsce do długotrwałego przebywania wirusa [2,4]. Pierwszym etapem infekcji jest etap adsorpcji, który polega na przyłączeniu się wirusa do powierzchni komórki. Osłonka zawierająca glikoproteiny adsorbuje się na receptorach błony komórkowej. Ponieważ wirus przenoszony jest zazwyczaj przez ślinę, etap fuzji wirusa z komórkami gospodarza przebiega najczęściej w jamie nosowo-gardłowej. Według niektórych naukowców wirus ulega fuzji z komórkami nabłonkowymi nosogardzieli, a następnie z limfocytami B przepływającymi przez pierścień Waldeyera. Inni z kolei sugerują bezpośrednie zarażenie limfocytów B. Szczególną rolę limfocytów B w rozwoju infekcji EBV odkryto obserwując chłopców chorych na zespół zaburzeń odporności – XLA (agammaglobulinemia związana

z chromosomem X, X-linked agammaglobulinemia). Jest to bardzo rzadka choroba genetyczna objawiająca się brakiem dojrzewania limfocytów B. Odkryto, że chłopcy dotknięci tą chorobą są szczególnie podatni na liczne infekcje, lecz odporni na zakażenie EBV. Nie stwierdzono przypadku zakażenia EBV u chorych z XLA, dlatego wysunięto hipotezę głoszącą, iż by doszło do infekcji EBV konieczna jest obecność dojrzałych limfocytów B [4,16]. Za tą hipotezą przemawia nieefektywność zakażenia komórek epitelialnych w hodowli. Przeciwnie, infekowanie *in vitro* limfocytów B skutkuje ich aktywną oraz ciągłą proliferacją linii immortalizowanych komórek limfoblastoidalnych (lymphoblastoid cell lines – LCL) [4]. W 2000 r. Faulkner i wsp. przedstawili prawdopodobny mechanizm wnikania wirusa Epsteina-Barr do limfocytów B. Hipoteza ta szczególną rolę przypisuje wyspecjalizowanym komórkom nabłonka (tzw. komórki M). Mają one transportować obce cząstki i antygeny do tkanki limfatycznej gardła na zasadzie transcytozy-transportu pęcherzykowego, podczas którego przenoszony materiał nie jest niszczone [16]. Mimo wielu wątpliwości dotyczących roli komórek epitelialnych w rozwoju infekcji, niewątpliwie komórki te mogą być infekowane przez EBV, gdyż stwierdza się przebieg latentnej infekcji w komórkach raka nosogardzieli oraz litycznej w leukoplakii włochatej [4].

Najlepiej scharakteryzowane białka biorące udział w fuzji wirusa z komórką gospodarza to: glikoproteiny gp350/220, gp85 (gH), gp42, gp25 (gL) oraz gp110 (gB) (tab. 2) [1,2,16]. Podczas fuzji wirusa z limfocytom B, z receptorem komórkowym CD21 (CR2) łączy się główna glikoproteina otoczki wirusa gp350/220 kodowana przez gen *BLLF1* [1,15]. Sekwencja gp350/220 (EDPGFFNVEI) jest bardzo podobna do sekwencji składowej C3 dopełniacza (EDPGKQLYNVEA), a receptor CD21 jest także receptorem tej składowej. Komórki epitelialne nie mają receptora CD21. Okazuje się, że do zakażenia komórek epitelialnych wystarczy występowanie kompleksu gH/gL oraz gB [2,4].

W łączeniu cząstki wirusa z błoną komórkową oraz w jego wnikaniu do komórek gospodarza ważną rolę pełnią gp25 (produkt genu *BKRF2*), gp85 (produkt genu *BXLF2*) i gp42 (produkt genu *BZLF2*). Udział tych glikoprotein wyjaśniły badania wykazujące, iż immunoglobuliny skierowane przeciwko gp85 (gH) uniemożliwiają wnikanie EBV do limfocytów B (otoczka wirusa nie ulega fuzji z błoną komórkową). Tak samo działają przeciwciała przeciwko gp42, nie zapobiegają one jednak fuzji wirusa z komórkami epitelialnymi. W łączeniu się EBV z komórkami gospodarza istotną rolę pełnią również antygeny zgodności tkankowej MHC (major histocompatibility complex, główny układ zgodności tkankowej) klasy II (HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ), z którymi to glikoproteina gp42 tworzy kompleksy, co aktywuje fuzję wirusa [2,16]. W następnym etapie infekcji materiał genetyczny wraz z osłaniającym go kapsydem przenika do cytoplazmy. Następnie dsDNA wędruje w stronę jądra komórkowego. Od tej chwili zakażenie może przyjąć zróżnicowany przebieg. Zainfekowana komórka gospodarza i jej aparat enzymatyczny może posłużyć do szybkiego namnażania EBV i uwolnienia wirionów potomnych w przebiegu cyklu litycznego wirusa, co skutkuje śmiercią zarażonej komórki. Wirus może też przejść w cykl latentny i w postaci utajonej bytować w limfocytach B, replikując się wraz z materiałem genetycznym gospodarza [10].

Tabela 1. Modele ekspresji genów cyklu latentnego EBV – trzy typy latencji

| Typ latencji EBV | Ekspresja genów EBV | Choroby wykazujące dany typ latencji |
|------------------|---|--|
| I | EBNA-1, EBERs, transkrypty BamH1A | chłoniak Burkitta |
| II | EBNA-1, LMP-1, LMP-2A, LMP-2B, EBERs, transkrypty BamH1A | chłoniak Hodgkina, rak nosogardzieli, chłoniak T-komórkowy |
| III | EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C EBNA-LP, LMP-1, LMP-2A, LMP-2B, EBERs, transkrypty BamH1A | choroby limfoproliferacyjne związane z immunosupresją |

CYKL LATENTNY

Zazwyczaj krótko po ekspozycji wirus Epsteina-Barr wchodzi w cykl lizogenny (ulega tzw. uśpieniu, czyli latencji). Stan latencji wytwarza się podczas bezobjawowej lub bardzo łagodnie przebiegającej infekcji. Wówczas genom wirusa ulega przemianie w kolisty, pozachromosomalny episom [2]. Za utrzymywanie DNA wirusa w postaci episomów odpowiedzialne jest jedno z białek wirusowych – antygen jądrowy EBNA-1 (Epstein-Barr nuclear antigen-1). W stanie latencji episomalny DNA wirusa replikuje się w populacji zarażonych limfocytów B i trafia do komórek potomnych żywiciela [15]. Replikacja ta jest zsynchronizowana z cyklem komórkowym. Podczas jednego cyklu komórkowego replikacja genomu wirusa również zachodzi jeden raz [2].

Jedna ze strategii wirusa, która ma na celu uniknięcie eliminacji przez układ immunologiczny, polega na zmniejszeniu liczby eksponowanych antygenów w fazie latentnej. W fazie tej mogą wystąpić trzy różne modele ekspresji genów (tab. 1). Wyróżnia się w związku z tym trzy typy latencji [2,8,12].

Zjawisko to jest wykorzystywane szczególnie w diagnostyce onkologicznej. Pierwszy model ekspresji genów skutkuje wystąpieniem utajenia typu I, w którym ekspresji ulega antygen jądrowy EBNA-1 oraz 2 małe jądrowe niekodujące RNA (Epstein-Barr encoded RNA): EBER-1, EBER-2. W utajeniu typu II dodatkowo ulegają ekspresji 3 latentne białka błonowe (latent membrane proteins): LMP-1, LMP-2A, LMP-2B. Utajenie typu III charakteryzuje się ekspresją genów dla 6 antygenów jądrowych: EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, EBNA-LP (EBNA leader protein) oraz wszystkich 3 LMP i obu EBER [12]. Nowsze prace wśród produktów cyklu latentnego wymieniają również tzw. rodzinę transkryptów regionu BamH1A genomu wirusa, których funkcja pozostaje nieznana (tab. 2) [4].

EBNA-1

EBNA-1 to fosfoproteina wiążąca się do swoistych sekwencji DNA (tab. 2). Jej obecność jest wymagana do utrzymania genomu EBV w zainfekowanych komórkach. EBNA-1 związane jest z utrzymywaniem DNA wirusa w postaci episomów, blokowaniem degradacji wirusa, ma też zdolność przyłączania się do skondensowanych ludzkich chromosomów. Wiadomo, że EBNA-1 wiąże się z dwoma miejscami fragmentu genomu OriP (origin of plasmid replication) i pełni główną rolę w replikacji, mechanizm ten nie jest jednak do końca wyjaśniony. Inne miejsca wiązania EBNA-1

to +10 i +34 nukleotydów od promotora Qp. Promotor Qp w odpowiedzi na wiele czynników transkrypcyjnych utrzymuje odpowiednie stężenie białka EBNA-1, jednak nadmierna ekspresja tego białka powoduje ujemne sprzężenie zwrotne: EBNA-1 związane w pobliżu promotora Qp zmniejsza poziom swojej ekspresji. EBNA-1 jest białkiem nieimmunogennym, niewykrywalnym przez limfocyty T cytotoksyczne. Wynika to z występowania powtórzeń tripletów aminokwasowych gly-gly-ala, co chroni to białko przed degradacją w proteasomach w szlaku zależnym od ubiquityny. W wyniku tego peptydy EBNA-1 nie są prezentowane przez cząsteczki HLA klasy I limfocytom T cytotoksycznym. W ten sposób zainfekowana komórka unika działania cytotoksycznego ze strony układu odpornościowego. Mechanizm ten najprawdopodobniej wpływa również na długi okres półtrwania EBNA-1 [4,5,18,20,23]. EBNA-1 pełni także funkcję aktywatora transkrypcji. Udowodniono, że przyczynia się do zwiększenia ekspresji LMP-1. Badania na myszach transgenicznym sugerują także, że białko EBNA-1 może odgrywać istotną rolę w onkogenezie [20,23].

EBNA-2

Kolejnym mechanizmem pozwalającym wirusowi przetrwać w zainfekowanych komórkach jest immortalizacja [8], czyli unieśmiertelnienie limfocytów B, które odbywa się przez zahamowanie apoptozy. Dotychczasowa wiedza dotycząca funkcji białek wirusowych w procesie immortalizacji jest rozległa, lecz niekompletna. Udało się ustalić, że białka EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3C oraz LMP-1 to białka konieczne do immortalizacji limfocytów B *in vitro* (tab. 2). Wymienione białka wspólnie przyczyniają się do ciągłej proliferacji zatrzymanych w limfoblastoidalnej fazie różnicowania limfocytów B oraz blokują przejście wirusa w cykl lityczny w większości zainfekowanych komórek [4]. Immortalizacja może być początkiem procesu nowotworzenia. Badając *in vitro* linie komórkowe limfocytów B przed i po immortalizacji wykazano, że jedynie te drugie mogą się stać rakotwórcze [2]. Główną rolę w immortalizowaniu limfocytów B pełnić ma białko jądrowe EBNA-2 (tab. 2). EBNA-2 to kwaśna fosfoproteina, będąca aktywatorem transkrypcji genów wirusowych i komórkowych. Razem z EBNA-LP jako pierwsze z białek cyklu latentnego pojawiają się w przebiegu infekcji. To białko jądrowe pobudza m.in. transkrypcję komórkowego protoonkogenu *c-myc*. Aktywność genu *c-myc* z kolei hamuje cykl komórkowy limfocytów B [2,4]. Białko EBNA-2 uznawane jest również za białko wpływające na zwiększoną ekspresję membranowych białek latentnych LMP-1, LMP-2A i LMP-2B, pobudza też ekspresję

Tabela 2. Niektóre produkty kodowane przez genom wirusa Epsteina-Barr i ich geny

| Gen | Produkt genu | Główna funkcja kodowanego produktu | Piśmiennictwo |
|---------------|--|---|------------------|
| BLLF1 | glikoproteina gp350/220 | główne białko otoczki wirusa, bierze udział w adsorpcji i fuzji wirusa | [1,2,15,16] |
| BXLF2 | gp85 (gH) | białko otoczki odpowiedzialne za integrację wirusa z komórką gospodarza | [1,2,4,16] |
| BKRF2 | gp25 (gL) | bierze udział w procesie łączenia lipidowej otoczki wirusa z błoną komórkową | [1,2,4,16] |
| BZLF2 | gp42 | glikoproteina uczestnicząca w fuzji wirusa z limfocytami B, tworzy kompleksy z białkami układu MHC klasy II | [1,2,16] |
| BALF4 | gp110 (gB) | bierze udział w procesie łączenia lipidowej otoczki wirusa z błoną komórkową | [1] |
| BKRF1 | EBNA-1 | bierze udział w replikacji, jest odpowiedzialne za utrzymywanie genomu w postaci episomu | [4,5,18,20,23] |
| BYRF1 | EBNA-2 | główna rola w immortalizacji limfocytów B | [2,4,20,23] |
| BLRF3-BERF1 | EBNA-3A | najprawdopodobniej aktywator transkrypcji | [2,4,20,23] |
| BERF2a-BERF2b | EBNA-3B | najprawdopodobniej aktywator transkrypcji | [2,4,20,23] |
| BERF3-BERF4 | EBNA-3C | najprawdopodobniej aktywator transkrypcji | [2,4,20,23] |
| BWRF1 | EBNA-LP | odgrywa główną rolę w indukcji transformacji blastycznej limfocytów B | [2,20,23] |
| BNLF1 | LMP-1 | bierze udział w transformacji blastycznej i onkogenezie, stymuluje ekspresję wielu białek komórkowych | [2,5,6,20,21,23] |
| BARF1/BNRF1 | LMP-2A | może hamować aktywność komórkowej kinazy tyrozynowej, zapobiega przejściu z fazy latentnej w lityczną | [2,6] |
| BNRF1 | LMP-2B | modulator aktywności LMP-2A | [2,6] |
| BARF0 | transkrypty regionu BamH1A | funkcje nieznane | [4,11] |
| BZLF1 | białko Z (ZEBRA) | kontrola przełączania cyklu latentnego w lityczny | [2,11,16] |
| BRLF1 | białko R | aktywator transkrypcji | [2,16] |
| BHRF-1 | wirusowy homolog inhibitora apoptozy Bcl-2 | prawdopodobnie bierze udział w hamowaniu zaprogramowanej śmierci komórki | [1] |
| BCRF1 | vIL-10 | białko wykazujące 84% homologii co do sekwencji aminokwasowej z ludzką IL-10 | [1] |
| BDLF2 | homolog cytokiny B1 | sugerowana homologia z cytokiną B1, prawdopodobnie późne białko cyklu litycznego | [1] |

receptorów CD23 i CD21. Ponadto EBNA-2 w immortalizowanych limfocytach B może wpływać na zmianę funkcji antygenów CD11a, CD18 oraz CD58 [2,20,23]. Istnienie dwóch typów EBNA-2 jest podstawą do rozróżnienia dwóch podtypów EBV.

BIAŁKA EBNA-3

EBNA-3A, EBNA-3B oraz EBNA-3C to hydrofilne białka jądrowe zawierające powtórzenia leucyny, izoleucyny lub waliny, które działają jako domeny dimeryzacji. Geny tych białek położone są w środkowej części genomu wirusa. EBNA-3A, EBNA-3B oraz EBNA-3C to najprawdopodobniej regulatory transkrypcji (tab. 2). EBNA-3B indukuje ekspresję wimentyny i CD40. EBNA-3C może

powodować wzrost ekspresji genów wirusowych (LMP-1) i komórkowych (CD21). Konieczne w procesie immortalizacji są EBNA-3A i -3C w przeciwieństwie do EBNA-3B [2,4,20,23].

EBNA-LP

Główną rolę w indukcji transformacji blastycznej limfocytów B pełnić ma białko EBNA-LP nazywane również EBNA-5 (tab. 2). EBNA-LP podobnie jak EBNA-2 pojawia się wcześniej w przebiegu infekcji i pobudza ekspresję genu *c-myc*. Naukowcom udało się wykazać potencjalny udział EBNA-LP w regulacji apoptozy zainfekowanych komórek. Ponadto EBNA-LP wchodząc w interakcje z EBNA-2 doprowadza do wprowadzenia spoczynkowych limfocytów B

w fazę G1 cyklu komórkowego, poprzez wiązanie i inaktywację komórkowych białek p53 i pRb (retinoblastoma protein) [2,20,23].

LMP-1

Innym białkiem wirusowym odpowiedzialnym za onkogenezę ma być białko LMP-1 (tab. 2). Udowodniono rolę tego białka w procesie transformacji blastycznej zainfekowanych komórek. Jest to integralne białko błonowe będące produktem genu *BLNF1*, składa się z 386 aminokwasów, jego masa cząsteczkowa wynosi 63 kDa. To zakotwiczone w błonie komórkowej białko wiąże się z wimentyną cytoszkieletu komórki. LMP-1 może występować w błonie komórkowej 10^5 cząsteczek na komórkę, składa się z trzech głównych domen:

- 1) N-końcowego ogona cytoplazmatycznego obejmującego aminokwasy 1–23,
- 2) sześciu hydrofobowych transbłonowych pętli (aminokwasy 24–186) odpowiedzialnych za agregację i oligomeryzację,
- 3) długiego C-końcowego cytoplazmatycznego regionu (aminokwasy 187–386).

Stwierdzone zmiany fenotypowe w limfocytach B zainfekowanych EBV, indukowane przez białko LMP-1 to m.in. ekspresja markerów aktywacji limfocytów B (CD23, CD39, CD40, CD44, HLA klasy II), zwiększone wytwarzanie cytokin (IL-6, -8, IL-10) oraz wzmożona ekspresja komórkowych molekuł adhezyjnych, takich jak ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1). LMP1 chroni zarażone limfocyty przed apoptozą przez zwiększanie ekspresji kilku antyapoptotycznych genów, takich jak *Bcl-2*, *Mcl-1* i *A2O* [2,6,20,23].

Białko LMP1 wykazuje powinowactwo do białek mających domenę charakterystyczną dla białek stanowiących wewnątrzkomórkowy fragment receptora czynnika martwicy nowotworów (tumor necrosis factor receptor-associated factor – TRAF). Czynniki martwicy nowotworów (tumor necrosis factor – TNF) może pobudzać wzrost niektórych linii nowotworowych, w tym wywodzących się z tkanki limfatycznej. Istnieją dwa typy receptora TNF wywołujące przeciwne efekty komórkowe. Receptor p55 związany jest z wywołaniem apoptozy, natomiast receptor p75 z proliferacją. LMP-1 wiążąc się z białkami TRAF związanymi z fragmentem receptora p75 powoduje wewnątrzkomórkową aktywację antyapoptotycznych czynników transkrypcyjnych NF- κ B (nuclear factor kappa B), AP-1 (activating protein 1) oraz STAT-1 (signal transducer and activator of transcription 1) [2,5]. Nowsze źródła wymieniają także białko LMP-2, jako biorące udział w tym mechanizmie. Interakcje LMP1 i LMP2 z białkami adaptacyjnymi TRAF-1 i TRAF-2 prowadzą do uaktywnienia kinazy NIK (NF- κ B inducing kinase), która fosforyluje kinazę I κ K1 (I κ kinase), a ta fosforylując inhibitor I κ B doprowadza do jego degradacji, co skutkuje uwolnieniem aktywnego czynnika NF- κ B. Aktywny czynnik NF- κ B transportowany jest do jądra komórkowego, gdzie wiąże się z sekwencjami regulacyjnymi genów, które kontroluje. Skutkiem zwiększonej aktywności czynnika transkrypcyjnego NF- κ B są zaburzenia metabolizmu komórkowego, wynikające z nadekspresji genów kontrolowanych przez NF- κ B, którymi są m.in. geny zaangażowane w regulację apoptozy oraz przebieg cyklu komórkowego [21].

Nadmierna ekspresja Bcl-2 wynikać ma ze wzmożonego uwalniania interleukiny 10 (IL-10). Nagakomi i wsp. wykazali rolę białka LMP-1 w indukcji uwalniania ludzkiej IL-10 przez komórki chłoniaka z limfocytów B. Ponadto wirusowy gen BCRF1 koduje wirusową IL-10 (vIL-10) o wysokim stopniu homologii, co do składu aminokwasowego, jak i działania do IL-10 ludzkiej (tab. 2). Zarówno IL-10, jak i vIL-10 hamują wytwarzanie interferonu γ (IFN- γ) przez komórki jednojądrzaste [19]. Skutkuje to brakiem hamowania wytwarzania białek wirusowych, co jest jedną z głównych funkcji IFN- γ .

LMP-2A i LMP-2B

LMP-2A i LMP-2B to integralne białka membranowe, różniące się między sobą domenami N-końcowymi (tab. 2). Fragment DNA kodujący białka latentne znajduje się na końcu genomu w miejscu terminalnych powtórzeń. Ekspresja tych białek jest możliwa tylko wtedy, gdy materiał genetyczny EBV ma postać episomalną [2]. Białko LMP-2A prawdopodobnie odpowiada za utrzymywanie wirusa w stanie latencji, ponieważ w warunkach laboratoryjnych delecja genu LMP-2A powoduje przejście wirusa w cykl lityczny [2,6]. LMP-2B najprawdopodobniej działa jako modulator aktywności LMP-2A. Podejrzewa się oba białka o wpływ na onkogenezę, lecz ta funkcja pozostaje niepewna.

EBERs

EBER1 i EBER2 są to dwa krótkie niekodujące odcinki RNA odkryte w 1981 r., złożone odpowiednio ze 167 i 172 zasad [23]. Są to produkty transkrypcji katalizowanej przez polimerazę III. Źródła literaturowe podają, że liczba kopii tych RNA w zainfekowanej komórce jest bardzo wysoka i może wynosić $5\text{--}10 \times 10^6$ w jednej zainfekowanej komórce [2,4,18]. Transkrypty EBER prawdopodobnie odpowiadają za regulację transkrypcji oraz przekazywanie informacji [2]. Możliwe, że indukują ekspresję antyapoptotycznego genu Bcl-2 oraz interleukiny 10 [4,23]. Szczególnie wysoki poziom ekspresji EBERs stwierdza się u chorych z chłoniakiem Burkitta i Hodgkina, rakiem nosogardzieli oraz w przebiegu mononukleozy zakaźnej [2]. Dzięki hybrydyzacji *in situ* EBERs zlokalizowano w jądrze komórkowym [18].

CYKL LITYCZNY

W wyniku przebiegu cyklu litycznego z zainfekowanej komórki uwalniane są wiriony potomne. Ma to na celu rozszerzenie pola zakażenia przez infekcję kolejnych limfocytów B oraz umożliwienie zarażenia kolejnych osób zwykle przez kontakt ze śliną nosiciela. Cykl lityczny występuje w początkowej fazie infekcji, trwa znacznie dłużej podczas ostrej infekcji pierwotnej, ale może wynikać również z reaktywacji wirusa. W jądrze komórkowym komórki gospodarza zachodzi replikacja oraz transkrypcja wirusowego DNA. Wirus wykorzystuje do tego celu aparat enzymatyczny gospodarza. Matrycowe RNA przechodzi do cytoplazmy, gdzie zachodzi translacja i odtworzenie białek wirusa. Materiał genetyczny wirusa podczas cyklu litycznego przybiera postać liniową, a ekspresji ulegają przede wszystkim geny białek zaangażowanych w replikację wirusowego DNA, formowanie kapsydu oraz w infekowanie

nowych komórek [2]. Włączane są m.in. geny tzw. antygenów wczesnych EA (early antigen), antygenów MA (membrane antigen) i białek kapsydu VCA (viral capsid antigen complex). Przeciwno tym białkom skierowana jest m.in. humoralna odpowiedź układu immunologicznego, co ma znaczenie w diagnostyce zakażeń EBV.

Pierwszym pojawiającym się białkiem w przebiegu cyklu litycznego wirusa jest białko Z, nazywane również białkiem ZEBRA (BamHI Z EBV replication activator) lub Zta (tab. 2). Białko to jest produktem genu *BZLF1* i uważane jest za bezpośredni aktywator transkrypcji genów cyklu litycznego [2,16]. Promotor genu *BZLF1* aktywowany jest fizjologicznymi zmianami zachodzącymi w zainfekowanych komórkach, sam zaś *BZLF1* prawdopodobnie reguluje własną transkrypcję oraz transkrypcję genu *BRLF1* kodującego białko R (tab. 2). Geny białek Z oraz R są nieaktywne w czasie latencji. Podczas cyklu litycznego spada poziom ekspresji MHC klasy I i II. Przeprowadzone w 2002 r. badania wykazują 4–5-krotny spadek ekspresji MHC klasy I oraz 40–50% redukcję ekspresji MHC klasy II oraz CD40 i CD54 w komórkach zainfekowanych litycznie w porównaniu do komórek zainfekowanych lizogenicznie. Badania wykazały również, że białko Z jest odpowiedzialne za blokowanie aktywacji ekspresji MHC klasy I, do której doprowadza białko LMP-1 wytwarzane także w fazie litycznej [11]. Kolejne białka pojawiające się we wczesnej fazie cyklu litycznego to produkty genów *BSMLF1* oraz *BMRF1*, ich rolą jest aktywacja kolejnych genów zaangażowanych w transkrypcję i translację. W początkowej fazie cyklu litycznego pojawiają się również produkty genów polimerazy DNA, reduktazy rybonukleotydowej i kinazy tymidynowej. Późna faza cyklu litycznego wirusa związana jest z wytwarzaniem białek, które modyfikują zainfekowane komórki lub też wchodzi w skład wirionów potomnych. Powstaje m.in. białko p150 (główne białko kapsydu), produkt genu *BNRF1* o masie 140 kDa, który prawdopodobnie buduje tegument wirusa oraz glikoproteiny zaangażowane w adsorpcję i fuzję EBV [2].

REAKTYWACJA EBV

Reaktywacja, czyli przejście wirusa z cyklu latentnego w lityczny występuje podczas upośledzonej odporności organizmu. Może to wynikać z zastosowania leczenia immunosupresyjnego. Reaktywację wirusa mogą wywołać też cytokiny, hormony steroidowe, czynnik wzrostu nowotworu. Spontaniczna reaktywacja zachodzi jeden raz na 10^2 – 10^6 komórek [2]. W przejściu wirusa ze stanu uśpienia w stan lityczny mają brać udział takie aktywatory transkrypcji jak białko *BZLF1* (białko Z) oraz białko *BRLF1* (białko R) (tab. 2). Białkiem charakterystycznym tego procesu jest białko Z. Silna ekspresja białka Z wzmacnia ekspresję białka R. Oba białka aktywują się wzajemnie do osiągnięcia poziomu stymulującego syntezę białek potrzebnych do replikacji wirusa [2,16]. Na podstawie obserwacji w warunkach laboratoryjnych wysunięto hipotezę wpływu zahamowania ekspresji *LMP-2A* na aktywację wirusa. Delecja genu *LMP-2A* niemal natychmiast uaktywnia replikację wirusa [2]. Reaktywacja EBV jest szczególnym przedmiotem zainteresowania transplantologów, ponieważ może stanowić zagrożenie życia pacjenta poddanemu immunosupresji. Klinicznie objawia się gorączką, zapaleniem płuc, wątroby, opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu. Stwierdza się również leukopenię i obecność

atypowych limfocytów we krwi. Reaktywacja EBV u osób po transplantacjach może wywołać rozwój potransplantacyjnej choroby limfoproliferacyjnej [2,15].

CHOROBOTWÓRCZOŚĆ

Bardzo skuteczna strategia przetrwania wirusa umożliwia EBV zarażanie prawie całej ludzkiej populacji [4,10]. Wirus Epsteina-Barr przenoszony jest zarówno przez ślinę, drogą kropelkową, drogą płciową, jak i przez przetoczenie krwi lub preparatów krwiopochodnych [2,8]. Podstawową chorobą wywoływaną przez EBV jest mononukleozą zakaźną (infectious mononucleosis – IM). Oprócz mononukleozy zakaźnej EBV może indukować wiele innych chorób, w tym choroby nowotworowe, wśród których wymienia się najczęściej endemicznie występującego chłoniaka Burkitta oraz inne chłoniaki niezziarnicze z limfocytów B (non-Hodgkin lymphomas – NHLs), raka nosogardzieli (nasopharyngeal carcinoma – NPC), najczęściej spotykanego wśród ludności azjatyckiej oraz ziarnicę złośliwą (chłoniak Hodgkina) [3,16]. W nowszych pracach pojawiają się hipotezy o wpływie infekcji EBV na rozwój raka żołądka oraz raka piersi. EBV wywołuje również zespoły limfoproliferacyjne u osób z wrodzonymi lub nabytymi niedoborami odporności. Podejrzewa się EBV o udział w patogenezie chorób autoimmunologicznych, alergicznych oraz w tzw. zespole przewlekłego zmęczenia [19].

PIERWOTNE ZAKAŻENIE – MONONUKLEOZA ZAKAŻNA

Wystąpienie pierwotnego zakażenia EBV (infectious mononucleosis – IM) odzwierciedla standardy socjoekonomiczne danego obszaru. W ubogich społeczeństwach zakażenie następuje we wczesnym dzieciństwie lub nawet niemowlęctwie. W krajach rozwiniętych natomiast do zarażenia dochodzi zazwyczaj w wieku młodzieńczym (15–24 rok życia). Infekcja wirusem przeżyta we wczesnym dzieciństwie zazwyczaj ma charakter bezobjawowy, czasami stwierdza się jedynie podwyższone wskaźniki enzymatyczne wątroby [8,16]. Natomiast w przypadku młodzieży i młodych osób dorosłych pierwotna infekcja EBV przybiera postać typowej gorączki gruczołowej w 30–50% przypadków [2,4,8]. Dlaczego tak się dzieje nie do końca wiadomo. Czynnikiem determinującym rozwój IM może być dawka przeniesionego przez ślinę wirusa. Zbyt mała wydaje się dawka przyjętego wirusa przez dziecko ssące zanieczyszczone wirusem przedmioty, w przeciwieństwie do bardzo dużej dawki wirusa przeniesionego przez pocałunki między młodymi ludźmi [4]. IM nazywana jest często chorobą pocałunków (kissing disease). Okres inkubacji EBV trwa zazwyczaj 30–50 dni [2,4,16]. Zarażone osoby immunokompetentne zazwyczaj zdrowieją, jednak u każdego zarażonego bez względu na przebieg infekcji genom EBV pozostaje w postaci latentnej w zainfekowanych limfocytach B. Ustala się stan równowagi, w którym 5–500 zainfekowanych komórek przypada na 10×10^6 recyrkulujących limfocytów B [4]. Objawy kliniczne IM to najczęściej tzw. triada obejmująca gorączkę, zapalenie gardła oraz powiększenie węzłów chłonnych [8]. Migdałki podniebienne pokrywają się kredowobiałą wydzieliną. Może wystąpić także hepatosplenomegalia, bóle mięśniowo-stawowe, obrzęk powiek, nasady nosa i twarzy oraz przelotna wysypka plamista. Cięższa wysypka rozwija się u chorych przyjmujących antybiotyki β -laktamowe. W 15% choroba

przebiega w postaci zapalenia wątroby, z niewielką żółtaczką. Proces zdrowienia trwa zazwyczaj 2-4 tygodni. Rzadko zdarzają się powikłania w przebiegu IM, takie jak: zajęcie ośrodkowego układu nerwowego (zespół Guillaina-Barrégo, wirusowe zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie pojedynczych nerwów lub wielonerwowe), zajęcie układu krążenia, zagrażająca obturacja dróg oddechowych, pęknięcie śledziony [2,15]. Najbardziej charakterystyczne zmiany hematologiczne we krwi osób chorych na mononukleozę zakaźną to: liczba leukocytów powyżej 10 G/l, odsetek limfocytów powyżej 40%, w tym atypowych powyżej 10%, ekspansja komórek CD8⁺ oraz odwrócenie proporcji CD4⁺ do CD8⁺ [2]. To właśnie limfocyty cytotoksyczne odpowiadają mają za typowe objawy IM, w wyniku masywnego wytwarzania cytokin, takich jak TNF- α , IL-1 β , IL-6 [10,11]. U osób z immunosupresją odwrotnie niż u osób immunokompetentnych stwierdza się przewagę limfocytów B nad limfocytami CD8⁺ [8].

Ważną rolę w przebiegu infekcji pierwotnej EBV mogą mieć choroby genetyczne. Odporni na EBV są chłopcy z XLA, natomiast zakażenie tym drobnoustrojem może stanowić ogromne zagrożenie dla chorych z zespołem Duncana (X-linked lymphoproliferative syndrome – XLPS). W przypadku defektu chromosomu X zakażenie EBV zazwyczaj prowadzi do śmierci spowodowanej uszkodzeniem wielu narządów. Najprawdopodobniej destrukcja tkanek spowodowana jest nadmierną niekontrolowaną odpowiedzią limfocytów CD8⁺ na pierwotną infekcję EBV [2,4].

CHOROBY ROZROSTOWE

EBV zaliczany jest do biologicznych czynników zwiększających prawdopodobieństwo powstania nowotworu (wirus onkogenny). Stymulacja proliferacji komórek docelowych przez wirusa może być przyczyną rozwoju licznych chorób nowotworowych. Wywodzą się one głównie z tkanki nabłonkowej lub limfatycznej. Do rozwoju nowotworów dochodzi, gdy zainfekowane wirusem komórki wymykają się spod kontroli mechanizmów obronnych gospodarza [4,7,15,16]. EBV wbudowując swój genom lub jego część do genomu komórki gospodarza może się przyczynić do modyfikacji funkcji biologicznych takiej komórki [5]. EBV może również wbudowywać się w różne miejsca genomu gospodarza i przenosić geny na inne chromosomy podczas mitozy. Może to doprowadzić do niekorzystnych dla gospodarza translokacji [2].

NIEZIARNICZE CHŁONIAKI ZŁOŚLIWE

Nieziarnicze chłoniaki złośliwe (non-Hodgkin lymphomas) NHLs należą do grupy najczęściej występujących chorób nowotworowych, jednak etiologia przeważającej części tych chorób nadal pozostaje niepewna. Wśród czynników związanych z rozwojem NHL wyróżnia się czynniki środowiskowe, immunologiczne oraz infekcyjne. Z tych ostatnich na pierwszym miejscu wymienia się EBV [17]. Wirus Epsteina-Barr spełnia wszystkie trzy warunki, pozwalające na uznanie go za czynnik etiologiczny chłoniaków nieziarniczych:

- 1) istnieje związek epidemiologiczny między występowaniem wirusa i chłoniaków nieziarniczych;
- 2) antygeny lub genom wirusa stwierdza się w komórkach NHLs;

- 3) EBV można wyizolować z tkanki nowotworowej i transformować nim komórki *in vitro*.

NHLs mogą wywodzić się zarówno z komórek linii B (większość), jak i komórek T lub NK [5].

CHŁONIAK BURKITTA

Chłoniak Burkitta (Burkitt's lymphoma – BL) jest szczególnym typem chłoniaka, który zazwyczaj przyjmuje postać guza żuchwy, rzadziej oczodołu. Inne umiejscowienia guza wymieniane w dostępnej literaturze to gonady, gruczoł sutkowy, wątroba, jelita oraz nerki [4,13]. Według większości klasyfikacji chłoniaków BL występuje w dwóch postaciach: endemicznej i sporadycznej [15]. Endemiczna postać BL dotyczy głównie dzieci z rejonu Afryki równikowej. W tym rejonie jest to najczęstszy nowotwór występujący u dzieci. Wirus Epsteina-Barr obecny jest w 96% przypadków endemicznie występującego BL [4]. W postaci sporadycznej wirusa wykrywa się w 20–30% przypadków [15]. EBV wykrywany w komórkach chłoniaka Burkitta ma postać episomalną, wykazującą ekspresję genów zbliżoną do tej występującej w utajeniu typu I. BL jest szybko rosnącym, bardzo złośliwym nowotworem, przypuszcza się, że jego rozwój jest wieloetapowy [17]. W obrazie histologicznym BL stwierdza się szybko proliferujące komórki, którymi są limfocyty B o średnicy 10–25 μ m, z zasadolub amfofilną cytoplazmą, zawierające okrągłe lub owalne jądra z licznymi jąderkami. Wśród utkania nowotworowego występują liczne makrofagi o jasnej cytoplazmie, co w obrazie mikroskopowym daje tzw. obraz gwiazdźdźistego nieba [4,13]. W rozwoju endemicznej postaci BL podejrzewa się udział malarii jako kofaktora, ze względu na nakładające się umiejscowienie geograficzne obu chorób, pewne dowody tłumaczące stan immunosupresji w przebiegu malarii oraz stwierdzony wpływ pewnych antygenów zarodźca malarii na poliklonalną aktywację limfocytów B. Okazuje się również, że osoby z cechą sierpowatokrwinkowości, która chroni przed malarią są również chronione przed rozwojem BL. Jednak dokładna rola malarii w rozwoju BL jest do tej pory niewyjaśniona [4]. Inny czynnik sprzyjający rozwojowi BL to konstytutywna ekspresja onkogenu *c-myc* doprowadzająca do ciągłej proliferacji komórek i zatrzymania ich różnicowania. We wszystkich chłoniakach Burkitta (tych związanych i niezwiązanych z zakażeniem EBV) stwierdza się jedną z trzech chromosomalnych translokacji: 8:14, 8:2, 8:22, które skutkują taką konstytutywną ekspresją. Są to translokacje materiału genetycznego z chromosomu 8 w regiony wzmacniające genów immunoglobulinowych na chromosomach 2, 14 lub 22, powodujące aktywację onkogenu *c-myc*, która może skutkować monoklonalnym rozrostem limfocytów B [4,13,17]. Powstawaniu takich zmian chromosomowych sprzyja stymulacja limfocytów B przez EBV [17].

W komórkach BL wykrywa się ekspresję antygeny wirusowego EBNA-1, stwierdza się również obecność transkryptów EBERs oraz transkryptów BamH1A. EBNA-1 jako nieimmunogenne białko warunkujące utrzymanie wirusa w zarażonych komórkach umożliwia skuteczne unikanie odpowiedzi ze strony układu odpornościowego, ale dotychczas wątpiono w jego samotne działanie w patogenezie nowotworu. Odkąd stwierdzono rozwój nowotworów wywodzących się z układu chłonnego u transgenicznych

myszy wykazujących ekspresję EBNA-1 (EBNA-1 transgenic mice) podejrzewa się to białko o działanie onkogenne *in vivo*. Według najnowszych klasyfikacji chłoniaków wyróżnia się również chłoniaka Burkitta związanego z niedoborem odporności, który występuje najczęściej u osób z AIDS. W tym wypadku stwierdza się niewielki wpływ wirusa EBV na patogenezę BL [4].

CHŁONIAK HODGKINA

Chłoniak Hodgkina (Hodgkin's lymphoma – HL) jest kolejną chorobą nowotworową układu chłonnego, podejrzewaną o etiopatogenezę powiązaną z infekcją EBV. HL stanowi około 20% wszystkich chłoniaków w krajach zachodnich i jest najczęstszym chłoniakiem występującym u młodych ludzi. Zachorowalność na HL ma tendencję wzrostową, obecnie wynosi 2-3 nowe przypadki na 100 000 osób rocznie, przy czym nieco częściej chorują mężczyźni.

W krajach zachodnich obserwuje się dwa szczyty zachorowań: pierwszy u młodych ludzi w wieku 15–35 lat, drugi u osób po 50 roku życia [4,13,21]. Chłoniak Hodgkina jest nietypowym nowotworem, ponieważ komórki nowotworowe stanowią zaledwie 1–2% całkowitej masy guza. Są to tzw. komórki Reeda-Sternberga (R-S) oraz komórki Hodgkina (H), nazywane wspólnie komórkami HRS (Hodgkin-Reed-Sternberg cells), wywodzące się z limfocytów B [4,6,21]. Przegrupowane geny łańcucha ciężkiego immunoglobulin w komórkach R-S-H charakteryzują się obecnością licznych mutacji, do których dochodzi w centrach rozmnażania grudek chłonnych. Dowodzi to pochodzenia tych komórek od limfocytów B germinalnych. W przeciwieństwie do germinalnych limfocytów B komórki R-S-H nie wykazują ekspresji rearanżowanych genów immunoglobulinowych [9]. Komórki HRS otoczone są naciekami z komórek reaktywnych (limfocyty B oraz T, eozynofile, neutrofile, komórki plazmatyczne, histocyty, fibroblasty) i łącznotkankowego zrębu, które stanowią przeważającą część tkanki guza [4,6]. W zależności od charakteru otoczenia komórek HRS klasyfikacja WHO z 2001 r. wyróżnia 4 podtypy typowej postaci HL: podtyp bogaty w limfocyty (lymphocyte rich – LR), ze stwardnieniem guzkowym (nodular scleriosis – NS), podtyp mieszanokomórkowy (mixed cellularity – MC) oraz ubogolimfocytarny (lymphocyte depletion – LD). Nieklasyczną postacią HL jest chłoniak Hodgkina z przewagą limfocytów (nonclassical lymphocyte predominant – NLP) [13,21]. Najsilniejszy związek między rozwojem HL a obecnością genomu EBV stwierdza się dla podtypu mieszanokomórkowego [4,6]. Komórki RS opisywane są jako komórki, których średnica wynosi zwykle 15–45 µm, komórka zawiera dwa jądra lub jedno o dwóch płatach, które przybierają charakterystyczny obraz „sowich oczu”. W utkaniu nowotworowym można spotkać też inne warianty komórek RS, takie jak: wariant jednojądrzasty, komórki lakunarne (zatokowe) oraz wariant limfocytarno-histocytny z charakterystycznym jądrem określanym jako „popcorn kernels” [13].

Obecnie uznaje się, iż wirus Epsteina-Barr to jeden z czynników etiologicznych rozwoju HL. W 1997 r. Międzynarodowa Agencja do Badań nad Rakiem (International Agency for Research on Cancer – IARC) uznała związek przyczynowy między infekcją EBV a występowaniem HL [9]. Genom EBV wykrywa się w około 50% przypadkach HL

w krajach zachodnich, odsetek ten jest większy w krajach rozwijających się, natomiast w południowej Afryce sięga 100%. Ponadto ryzyko rozwinięcia się HL jest trzy-czterokrotnie wyższe u osób, które przeżyły infekcję EBV niż ogólne ryzyko populacyjne [4,21]. W komórkach HRS wykrywane są białka wirusowe, takie jak EBNA-1, LMP1, LMP2A oraz LMP2B. Dodatkowo wykrywa się EBERs i transkrypty BamHI A. Jest to charakterystyczny model ekspresji dla utajenia typu II [2,6,12]. Jednym z mechanizmów patogenetycznych obserwowanych w komórkach HRS jest opisana we wcześniejszym rozdziale konstytutywna ekspresja NF-κB wywoływana przez białka LMP. Geny ulegające zwiększonej ekspresji w komórkach HRS pod wpływem NF-κB to m.in. geny związane ze wzmożoną proliferacją (CDK1, CDK2, CDK6, STAT 5, STAT 6, gen cyklin A, B1 oraz D), geny związane z hamowaniem apoptozy, takie jak *Bcl-x_L*, *A1/Bfl-1*, *C-IAP2* i *TRAF1*. Ponadto wzmożonej ekspresji ulegają także autokryny czynnik wzrostu komórek HRS, jakim jest IL-13, czynnik wzrostu kolonii granulocytarno-makrofagowych oraz białka adhezyjne [21].

POTRANSPLANTACYJNA CHOROBA LIMFOPROLIFERACYJNA

Termin „potransplantacyjna choroba limfoproliferacyjna” (post-transplantation lymphoproliferative disease – PTLD) obejmuje heterogenną grupę chorób, których przyczyną jest niekontrolowana proliferacja komórek układu chłonnego. Wśród tych zaburzeń wyróżnia się zespoły proliferacyjne o różnym stopniu nasilenia. Są to m.in.: łagodny zespół mononukleozopodobny, poliklonalna lub monoklonalna hiperplazja limfocytów, agresywne chłoniaki o wysokim stopniu złośliwości. Najczęściej w sposób niekontrolowany dzielą się limfocyty B (ponad 90% przypadków PTLDs), znacznie rzadziej limfocyty T (9%) i komórki NK (0,5%). Zazwyczaj PTLDs wywołane są przez wirusa Epsteina-Barr, ale do czynników ryzyka zalicza się też infekcję wirusem cytomegalii (cytomegalovirus – CMV). Przyczyną rozwinięcia się PTLDs może być pierwotna infekcja EBV, ale także reaktywacja u pacjenta po transplantacji. Choroba rozwija się w wyniku transformacji blastycznej komórek zainfekowanych przez EBV przy jednoczesnym upośledzeniu funkcji limfocytów T spowodowanym immunosupresją. W warunkach fizjologicznych u nosicieli EBV swoiste limfocyty T cytotoksyczne eliminują zainfekowane komórki, dzięki czemu ustala się swoisty stan równowagi, w którym tylko niewielka liczba zainfekowanych komórek znajduje się w krwiobiegu [10]. Supresja odpowiedzi komórkowej, spowodowana lekami immunosupresyjnymi zaburza ten stan równowagi przez zmniejszenie EBV-swoistych limfocytów CD8⁺. Jeżeli dojdzie do reaktywacji EBV będzie się on intensywnie namnażał i infekował kolejne limfocyty B. Ponadto niedobór odporności w tym wypadku może być pogłębiany przez uszkodzenie limfocytów B przez EBV. Skutkuje to wymknięciem się spod kontroli układu odpornościowego zainfekowanych przez wirusa limfocytów B, które ulegają niekontrolowanej poliklonalnej proliferacji. Mutagenne działanie wirusa oraz częste rearanżacje genów łańcuchów immunoglobulin mogą spowodować groźne mutacje, transformację złośliwą limfocytów B i w konsekwencji ich monoklonalną ekspansję. Reaktywacja wirusa u pacjenta po transplantacji objawia się najczęściej gorączką, zapaleniem płuc, zapaleniem wątroby, leukopenią. We krwi pojawiają się atypowe

limfocyty [2]. Częstość występowania tych zaburzeń związana jest z rodzajem przeprowadzonego przeszczepu, zastosowanym leczeniem immunosupresyjnym oraz z wystąpieniem reakcji przeszczep przeciwko biorcy (GvHD). Po przeszczepie nerki choroba limfoproliferacyjna występuje u prawie 2% pacjentów, po przeszczepie serca w 5% przypadków, po przeszczepie płuca 5–10%, po przeszczepie wątroby 5–15% i u około 1% pacjentów po przeszczepie szpiku kostnego [2]. Najwyższe ryzyko PTLDs sięgające 20% dotyczy pacjentów po transplantacji jelit. Ryzyko rozwoju PTLDs wzrasta też po usunięciu limfocytów T z materiału przeszczepowego w alotransplantacji komórek macierzystych szpiku (z 1–3–24%) oraz gdy biorca przeszczepu jest EBV-seronegatywny i dochodzi do pierwotnej infekcji wirusem przeniesionym razem z narządem od dawcy EBV-seropozytywnego. W PTLDs w przypadku transplantacji szpiku kostnego zawsze dochodzi do proliferacji transformowanych limfocytów B dawcy (limfocyty biorcy usuwane są wskutek chemioterapii) [2,5]. Śmiertelność w wyniku PTLD wynosi 40–80% w przypadku przeszczepu narządu łitego, w przypadku przeszczepu szpiku może sięgać 90%. U dzieci poddanych przeszczepom występowanie PTLDs jest znacznie wyższe (50%), natomiast śmiertelność jest niższa (20%) [10]. Choroba pojawia się zazwyczaj w przebiegu pierwszych 6 miesięcy po przeszczepie. Leczenie PTLDs jest trudne i polega na zmniejszeniu dawki leków immunosupresyjnych, co może się przyczynić do odrzucenia przeszczepionego narządu. Niektóre centra transplantologii stosują chemioterapię w leczeniu PTLDs, obecnie pracuje się również nad stworzeniem alternatywnych metod immunoterapeutycznych z zastosowaniem przeciwciał anty CD20 (Mabthera). Guzy pojawiające się w przebiegu PTLDs składają się głównie z komórek limfoblastoidalnych wykazujących ekspresję m.in. znanych wirusowych onkogenów EBNA-2 oraz LMP-1. Obecnie przypuszcza się, że do transformacji komórki zainfekowanej wirusem Epsteina-Barr w komórkę nowotworową wymagany jest jeszcze epizod genetyczny lub epigenetyczny skutkujący zaburzeniem dojrzewania limfocytów B. Ponadto na podstawie badań myszy SCID (severe combined immunodeficiency) sugeruje się wpływ nie zrównoważonego wytwarzania cytokin, takich jak IL-2, -4, -6, -10 [4].

RAK JAMY NOSOGARDŁOWEJ

Rak jamy nosogardłowej (nasopharyngeal carcinoma – NPC) to nowotwór wywodzący się z komórek epitelialnych nosogardzieli. Sporadycznie występuje w krajach zachodnich, znacznie częściej w krajach azjatyckich (głównie południe Chin) oraz w północnej Afryce. Najczęściej występuje u osób starszych lub w średnim wieku. Dodatkowy wzrost zachorowań u osób młodszych obserwuje się w północnej Afryce [4]. Uznaje się udział trzech czynników etiologicznych w rozwoju NPC, którymi są:

- predyspozycja genetyczna,
- kancerogeny chemiczne,
- infekcja EBV [1,4].

NPC to trzeci pod względem częstości występowania nowotwór w południowych Chinach (15–50 zachorowań na 100 tys. mieszkańców). Tak częste występowanie NPC w tym rejonie wiązać się ma m.in. z haplotypem HLA A2-B46 u Chińczyków [1]. Wśród kancerogenów

chemicznych największe znaczenie mają mieć nitrozaminy obecne w solonych potrawach rybnych popularnych w tej części świata [1,14]. Prawdopodobnie niedobór witaminy C w młodym wieku również może być jednym z kofaktorów rozwoju NPC [22]. Związek między infekcją EBV a rozwojem NPC ustalono już w 1973 r., ponadto IARC zaliczył EBV do kancerogenów grupy I, m.in. ze względu na tę zależność. Obecność EBV stwierdza się w prawie 100% przypadków NPC [1,4,14]. Mimo to rola EBV w patogenezie tej choroby pozostaje nieoczywista. Kontrowersje budzą zwłaszcza sprzeczne wyniki uzyskiwane przez niezależne grupy badawcze dotyczące obecności EBV w komórkach epitelialnych nosogardzieli. Ponadto nie poznano do tej pory dokładnego mechanizmu infekowania komórek epitelialnych przez EBV. Obecnie podejrzewa się, że wirus nie jest pierwotną przyczyną nowotworu, a jedynie jednym z wielu czynników w złożonym procesie patogenezy NPC [1,14,].

RAK ŻOŁĄDKA

Infekcja EBV może być powiązana z rozwojem raka żołądka (gastric carcinoma). Obecność genomu EBV wynosi >90% dla raka limfatyczno-nabłonkowego (lymphoepithelioma-like gastric carcinoma) i 5–25% dla gruczolakoraków żołądka (gastric adenocarcinomas). Czy EBV pełni patogenetyczną rolę w rozwoju tych nowotworów nie jest pewne. W przypadku raka limfatyczno-nabłonkowego proponowana jest hipoteza rozsiewu cząstek wirusa z nosogardzieli do żołądka. W przypadku gruczolakoraków żołądka, wnikanie EBV do komórek epitelialnych nie jest uzależnione od receptorów, dochodzić może bowiem do wiązania przeciwciał IgA z cząstkami wirusowymi wywodzącymi się z limfocytów B i wychwyty tych cząsteczek przez komórki epitelialne [1].

W gruczolakorakach żołądka wirus wykazuje nowy typ latencji z wytwarzaniem BARF-1 proteiny wykazującej pewną homologię z cząsteczką przylegania międzykomórkowego ICAM-1 oraz brakiem LMP-1. Mimo iż każdy mechanizm związany z EBV prowadzący do nowotworów żołądka pozostaje spekulatywny, obserwuje się opóźnienie apoptozy oraz spadek tempa różnicowania komórkowego w rakowych komórkach EBV-pozytywnych [1].

RAK PIERSI

Wpływ infekcji EBV na rozwój raka piersi pozostaje kontrowersyjny. W niektórych przypadkach wykryto wirusa w guzach nowotworowych, ale jednocześnie napotyka się doniesienia o licznych próbach zakończonych uzyskaniem negatywnych wyników [1].

DIAGNOSTYKA

Podstawowe znaczenie w diagnostyce pierwotnej i wtórnej infekcji EBV mają wyniki badań serologicznych (tab. 3). Ponieważ EBV stymuluje zainfekowane limfocyty B do wydzielania przeciwciał, przebieg infekcji stwierdza się na podstawie wykrycia przeciwciał heterofilnych klasy IgM oraz swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko białkom wirusowym. Przeciwciała heterofilne pojawiają się w pierwszym tygodniu po infekcji EBV u 50% chorych, u 60–90% po dwóch następnych tygodniach, a u 20% chorych utrzymują się przez około 2 lata. Najwyższe

Tabela 3. Najpopularniejsze metody diagnostyki zakażeń EBV oraz interpretacja wyników – opis w tekście [1,2,8,15,16]

| | Zakażenie pierwotne | Przebyta infekcja | Reaktywacja | PTLDs |
|-----------------------------------|---------------------|-------------------|-------------|-------|
| Przeciwciała heterofilne | + | - | +/- | +/- |
| VCA IgM | + | -/+ | + | +/- |
| VCA IgG | + | + | + | +/- |
| EA IgG | + | - | + | +/- |
| EBNA-1 IgG | - | +/- | + | +/- |
| Awidność VCA IgG | Niska | Wysoka | Wysoka | |
| EBERs hybrydyzacja <i>in situ</i> | | | | + |
| EBV PCR | + | | + | + |

stężenie tych przeciwciał przypada zazwyczaj na 2–3 tydzień infekcji [2,15]. Badaniem na obecność przeciwciał heterofilnych jest komercyjny zestaw diagnostyczny tzw. Monospot, oparty na aglutynacji końskich erytrocytów. Jest to nowoczesna wersja testu szkiełkowego Paula-Bunnella-Davidsohna (PBD). Zaletą testu hemaglutynacyjnego jest możliwość uzyskania szybkiego wyniku, natomiast wadą – stosunkowo niewielka czułość (63–84%). Wyniki fałszywie ujemne u chorych w ostrej fazie mononukleozy mogą sięgać 10–20%. Wyniki fałszywie ujemne i wątpliwe często zdarzają się także u dzieci poniżej 5 roku życia oraz w diagnostyce innych zespołów chorobowych związanych z infekcją EBV. W takim wypadku zaleca się badania serologiczne w kierunku obecności przeciwciał swoistych [2,15]. Inne komercyjnie dostępne testy aglutynacji wykrywające obecność przeciwciał heterofilnych używają erytrocytów pozyskanych z baranów lub byków. Wcześniej takie erytrocyty poddawane są preabsorpcji z użyciem ekstraktu z nerek świń morskich [8]. Przeciwciała swoiste, mające znaczenie diagnostyczne, skierowane są przeciwko antygenowi kapsydowemu VCA (viral capsid antigen), białkom fazy wczesnej EA (early antigens) i rodzinie antygenów jądrowych EBNA [8]. Pierwsze w przebiegu infekcji pojawiają się przeciwciała klasy IgM skierowane przeciwko VCA. Przeciwciała te osiągają najwyższe miano w 2–3 tygodnie od zakażenia, utrzymują się do 3–4 miesięcy. Następnie pojawiają się VCA IgG. Te przeciwciała wykrywane są przez całe życie u osoby raz zainfekowanej wirusem Epsteina-Barr. Najwyższy poziom przeciwciał IgG przeciwko VCA przypada na 2–3 miesiące infekcji. Kolejne pojawiają się przeciwciała klasy IgG przeciwko EA (EA IgG) świadczące o replikacji wirusa [16] między 3–4 tygodniem a 3–4 miesiącem od zakażenia, następnie EA IgG zanikają. Przeciwciała przeciwko EBNA-1 są wytwarzane w późniejszej fazie infekcji i zazwyczaj pozostają obecne w surowicy przez całe życie [8]. Charakterystyczny dla infekcji pierwotnej jest więc pozytywny wynik dla przeciwciał VCA IgM i VCA IgG oraz negatywny wynik dla przeciwciał przeciwko EBNA-1 (tab. 3). Zanikanie VCA IgM i pojawienie się przeciwciał dla EBNA-1 świadczy o rekonwalescencji. Jednak u osób z niedoborem odporności lub u pacjentów z chroniczną postacią mononukleozy, przeciwciała dla EBNA-1 mogą pozostać niewykrywalne. Zdarzyć się to może także u seropozytywnych osób immunokompetentnych [1,2,8,15].

Reaktywacja wirusa może powodować ponowne pojawienie się przeciwciał VCA IgM. Należy jednak pamiętać, że u niektórych osób VCA IgM, z nieznanymi przyczynami, pozostają wykrywalne długo po pierwotnej infekcji [1,8]. Do dzisiaj nie ustalono jednoznacznego kryterium rozpoznania reaktywacji EBV. Pod uwagę bierze się wiele parametrów, takich jak: wzrost miana EA IgG lub EA IgA, serokonwersja EA IgM, spadek poziomu EBNA IgG i wzrost miana VCA IgG lub jednoczesne pozytywne wyniki dla EA IgM i EBNA IgG. Serologicznym markerem reaktywacji wirusa miały być przeciwciała klasy IgG skierowane przeciwko białku ZEBRA, które kontroluje przełączanie EBV z cyklu latentnego w lityczny. Jednak ZEBRA IgG, mimo iż rzadko wykrywane u zdrowych osób seropozytywnych (2–4%), często wykrywane są u pacjentów z rakiem nosogardzieli (75–87%), a także w przebiegu mononukleozy zakaźnej (85%) [1].

Metodami stosowanymi w detekcji przeciwciał swoistych są przede wszystkim metody immunoenzymatyczne (enzyme immunoassay – EIA), wśród których najszerzej stosowany jest test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) [2,8,15]. W testach typu ELISA do antygeny związanej z fazą stałą przyłącza się wykrywane przeciwciało, do niego z kolei dołącza się kompleks przeciwciało-enzym. Przyłączony enzym katalizuje reakcję barwną. Intensywność tej barwy koreluje ze stężeniem wykrywanego antygeny, co umożliwia odczytanie stężenia z krzywej standardowej. W diagnostyce serologicznej zakażeń EBV przydatny jest także pomiar awidności przeciwciał VCA IgG i EA IgG, umożliwiającą odróżnienie wtórnej infekcji od pierwotnej zarówno u osób immunokompetentnych, jak i u tych z upośledzoną odpornością (tab. 3) [1,2,8].

Metody immunohistochemiczne oraz immunofluorescencyjne pozwalają na wizualizację reakcji przyłączania swoistych znakowanych przeciwciał monoklonalnych do badanych antygenów. Metody te umożliwiają detekcję oraz określenie lokalizacji antygenów EBV w zainfekowanych komórkach. Powszechne testy immunohistochemiczne to m.in. awidyna-streptawidyna (avidin-streptavidin conjugates) oraz APPAP (alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase). W metodzie immunofluorescencyjnej przeciwciała monoklonalne związane są zwykle z fluoresceiną. Tą metodą wykrywa się najczęściej białko Z, EBNA-2 oraz

LMP [2]. Przeciwciała monoklonalne białek latentnych EBNA-2 i LMP-1 stosuje się przede wszystkim w wykazaniu ekspresji wirusowej w PTLs, chłoniaku Hodgkina, raku jamy nosogardłowej. Jednak w związku ze zmienną ekspresją białek latentnych oraz ograniczeniami technicznymi metod diagnostycznych, ujemne wyniki dla tych białek nie muszą świadczyć o nieobecności EBV [1].

Dostępność metod biomolekularnych poszerza znacznie możliwości diagnostyczne (tab. 3). Metody te stosowane są głównie w celu wykrywania EBV na poziomie tkanek, co ma znaczenie w diagnostyce onkologicznej. Stosuje się je także w stwierdzaniu zakażenia EBV i monitorowaniu poziomu DNA/mRNA wirusa u pacjentów w stanach immunosupresji [1,2,15]. W wykrywaniu wirusa stosuje się przede wszystkim następujące metody biologii molekularnej: hybrydyzacja *in situ*, PCR oraz real time PCR. Hybrydyzacja *in situ* pozwala na wykrycie materiału genetycznego wirusa w zainfekowanych komórkach. Zastosowanie proteinazy K i wysokiej temperatury umożliwia wnikanie sondy do komórek. Następnym etapem hybrydyzacji sondy z komplementarnymi sekwencjami mRNA. Po odplukaniu nadmiaru reagentów wykrywa się hybrydy (detekcja sond znakowanych fluoresceiną za pomocą cytometrii przepływowej lub metod immunocytochemii) [2]. Czułą oraz swoistą techniką w diagnostyce zakażeń EBV jest wykrywanie transkryptów EBERs metodą hybrydyzacji *in situ*. Metoda ta w tym wypadku sprawdza się głównie dzięki intensywnemu wytwarzaniu EBERs w przebiegu cyklu latentnego EBV (około 10 mln kopii na komórkę). Dzięki hybrydyzacji *in situ* genom EBV zlokalizowano m.in. w komórkach Reeda-Sternberga i komórkach Hodgkina. Tą techniką EBV może być wykryty także w guzach epitelialnych i limfoidalnych związanych etiopatologicznie z EBV oraz w hodowanych liniach komórkowych. Wyjątkiem są tutaj niektóre nowotwory wątrobowokomórkowe i OHL (oral hairy leukoplakia), w przebiegu których EBERs nie ulegają ekspresji [1]. PCR, czyli łańcuchowa reakcja polimerazy (polimerase chain reaction) pozwala na amplifikację szukanego fragmentu DNA.

W metodzie tej zastosowanie znalazły syntetyczne startery nukleotydowe oraz termostabilne polimerazy DNA. Amplifikacji poddaje się różne fragmenty genomu EBV. W przypadku reakcji PCR często powiela się sekwencje genów *BZLF1*, *BNLF1*, *BYRF1*, element BamHIW, oraz geny obu EBERs. W reakcjach odwrotnej transkrypcji połączonej z PCR często wybiera się sekwencje transkryptów BKRF1, BamHI A oraz EBERs [3,7,24].

W półilościowym badaniu PCR, z zastosowaniem hybrydacji nowo powstałych fragmentów genomu wirusa z sondami biotynylowanymi możliwe jest oszacowanie liczby kopii wirusa na podstawie spektrofotometrycznych pomiarów reakcji barwnej. Dokładne określenie liczby kopii EBV jest możliwe po zastosowaniu reakcji PCR w czasie rzeczywistym (real time PCR), w której stosuje się sondy hybrydacyjne typu Taq-Man lub fluorochromy interkalujące DNA, takie jak Sybr Green [1,2].

PODSUMOWANIE

Wirus Epsteina-Barr skutecznie i trwale infekuje ponad 90% ludzkiej populacji. U części osób zainfekowanych, w pewnych warunkach EBV może wpływać na rozwój ciężkich chorób, takich jakimi są nowotwory. W ostatnich latach wiele dowiedzieliśmy się na temat cyklu życiowego EBV oraz funkcji białek wirusowych, jednak dokładne mechanizmy infekowania komórek docelowych (szczególnie mechanizm infekowania komórek epitelialnych) oraz mechanizmy transformacji nowotworowej pozostają niewyjaśnione. Ciągłe brakuje bezpośrednich dowodów na wpływ infekcji EBV na indukowanie wielu chorób nowotworowych. Hipotezą pozostaje wpływ EBV na indukcję chorób alergicznych i autoimmunologicznych. Szczególne nadzieje wiąże się ze szczepionkami na EBV, które nie tylko zahamowałyby rozprzestrzenianie się wirusa, ale także przez ewentualną redukcję zachorowań stanowiłyby element profilaktyki konkretnych nowotworów. Trwa obecnie II faza badań klinicznych nad szczepionką opartą o rekombinowaną gp350/220 wirusa EBV [22].

PIŚMIENICTWO

- [1] Aalto S.: Modern diagnosis of Epstein-Barr virus infections and post-transplant lymphoproliferative disease. <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/20451/modern.pdf?sequence=1> (19.04.2011)
- [2] Bienias J., Krzemiński J., Mazurek U.: Charakterystyka wirusa Epsteina-Barr – aspekty epidemiologiczne, biomolekularne i transplantologiczne. *Postępy Mikrobiol.*, 2007; 46: 153–165
- [3] Bonnet M., Guinebreiere J.M., Kremmer E., Grunewald V., Benhamou E., Contesso G., Joab I.: Detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancers. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1999; 91: 1376–1381
- [4] Crawford D.H.: Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2001; 356: 461–473
- [5] Dobrzańska J., Sawczuk-Chabin J., Warzocha K.: Rola wirusów w etiopatogenezie chłoniaków niezłośliwych. *Onkol. Prakt. Klin.*, 2006; 2: 64–72
- [6] Flavell K.J., Murray P.G.: Hodgkin's disease and the Epstein-Barr virus. *Mol. Pathol.*, 2000; 53: 262–269
- [7] Glaser S.L., Hsu J.L., Gulley M.L.: Epstein-Barr virus and breast cancer: state of the evidence for viral carcinogenesis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2004; 13: 688–697
- [8] Hess R.D.: Routine Epstein-Barr virus diagnostics from the laboratory perspective: still challenging after 35 years. *J. Clin. Microbiol.*, 2004; 42: 3381–3387
- [9] Juszczyński P., Czyż J., Kalinka E., Warzocha K.: Etiopatogeneza chłoniaka Hodgkina. *Acta Haematol. Pol.*, 2003; 34: 277–286
- [10] Karst J., Konopka L.: Poprzeszczepowa choroba limfoproliferacyjna. *Onkol. Pol.*, 2005; 8: 209–216
- [11] Keating S., Prince S., Jones M., Rowe M.: The lytic cycle of Epstein-Barr virus is associated with decreased expression of cell surface major histocompatibility complex class I and class II molecules. *J. Virol.*, 2002; 76: 8179–8188
- [12] LMP antibody. <http://www.antibodies-online.com/productsheets/en/ABIN370625.pdf> (16.01.2011)
- [13] Marszałek A.: Chłoniaki głowy i szyi – diagnostyka i biologia molekularna – obecny stan wiedzy. *Post. Chir. Głowy Szyi*, 2006; 5: 83–98
- [14] Niedobitek G.: Epstein-Barr virus infection in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Mol. Pathol.*, 2000; 53: 248–254
- [15] Piecyk-Sidor M., Polz-Dacewicz M.A.: Rola wirusa Epsteina-Barr w chorobach oczu. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2005; 59: 602–607
- [16] Roszkowiak B., Niemiński Z.L.: Udział wirusa Epsteina-Barr w patogenezie tocznia rumieniowatego układu nerwowego i chorób nerek. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2004; 58: 390–397
- [17] Sawczuk-Chabin J., Centkowski P., Biliński P., Warzocha K.: Epidemiologia niezłośliwych chłoniaków złośliwych. *Acta Haematol. Pol.*, 2004; 35: 131–144
- [18] Swaminathan S.: Noncoding RNAs produced by oncogenic human herpesviruses. *J. Cell. Physiol.*, 2008; 216: 321–326
- [19] Szmidt A., Stańczyk-Przyłuska A.: Rola wirusa EBV w patogenezie chorób alergicznych. *Alerg. Astma Immunol.*, 2005; 10: 169–174

- [20] Thompson M.P., Kurzrock R.: Epstein-Barr virus and cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2004; 10: 803–821
- [21] Warzocha K., Juszczyński P., Biliński P., Czyż J.: Postępy w biologii i leczeniu chłoniaka Hodgkina. *Onkol. Prakt. Klin.*, 2005; 1: 83–95
- [22] WHO: Initiative for Vaccine Research. Viral cancers. http://www.who.int/vaccine_research/diseases/viral_cancers/en/index1.html (26.08.2009)
- [23] Young L.S., Murray P.G.: Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene*, 2003; 22: 5108–5121
- [24] Zawilińska B., Piątkowska-Jakubas B., Kopeć J., Daszkiewicz E., Kleszcz E., Szostek S., Mensah-Glanowska P., Hawrylecka D., Skotnicki A.: Zakażenia wirusem Epsteina-Barr (EBV) u pacjentów leczonych allogenicznym przeszczepieniem komórek hemopoetycznych (allo-HCT). *Przegl. Epidemiol.* 2006; 60: 87–92

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.