

Polona Klemenc¹, Jožica Marin²

Onkogeno delovanje herpesvirusov

Herpesviruses and their Oncogenic Activity

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: celica transformacija virusa, onkogeni virusi, tumorske virusne infekcije, RNK virusi, DNK virusi, herpesvirusi

Prvi humani onkogeni virus, virus Epstein-Barr, so odkrili leta 1964 v celicah Burkittovega limfoma. Onkogeni virusi so pomembni, ker so vpleteni v nastanek 15 % rakavih obolenj pri človeku in ker so sposobni aktivirati verigo dogodkov, ki lahko podobno kot drugi karcinogeni dejavniki vodijo v maligne spremembe. Danes vemo, da retrovirusi ne povzročajo rakavih sprememb samo pri živalih, ampak tudi pri človeku. Človeške onkogene viruse uvrščamo v družine papilomavirusov, herpesvirusov, flavivirusov, retrovirusov in hepadnavirusov. Med herpesvirusi sta zlasti pomembna virus Epstein-Barr in virus herpesa simpleksa 2. Vse več pa je tudi dokazov o onkogenem delovanju virusa citomegalije in človeškega herpesvirusa 6 in 8. Prihodnost v boju proti malignim spremembam, ki jih povzročajo virusi, temelji predvsem na imunizaciji, s katero bi ljudi in živali zaščitili pred onkogenimi virusi.

ABSTRACT

KEY WORDS: cell transformation viral, oncogenic viruses, tumor virus infections, RNA viruses, DNA viruses, herpesviridae

The first human tumour virus, virus Epstein-Barr, was discovered in 1964 in Burkitt's lymphoma cells. Oncogenic viruses are important for two main reasons. Firstly, approximately 15% of human cancer incidence can be attributed to a viral infection. Secondly, oncogenic viruses are analogous to other mutagenic carcinogens, being capable of initiating a chain of two or more events possibly leading to malignancy. Today it is known that many retroviruses produce tumours in domestic animals, and one has been implicated as a cause of human leukemia. The hepatitis B virus, flaviviruses, herpes viruses, especially the Epstein-Barr virus and herpes simplex virus 2, and several papillomaviruses are also implicated in cancer in humans. The greatest prospect for significantly reducing the frequency of cancer in humans is through immunisation against infection with oncogenic viruses.

¹ Mag. Polona Klemenc, dipl. univ. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Zaloška 4, 1000 Ljubljana.

² Prof. dr. Jožica Marin, dipl. univ. biol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Zaloška 4, 1000 Ljubljana.

UVOD

Tumorji nastanejo zaradi spremembe v izražanju enega ali več genov, ki uravnavajo celično rast in/ali diferenciacijo. Genetske spremembe lahko povzročijo kemični in fizikalni dejavniki ter določeni virusi (1).

Razvoj maligne spremembe je večstopenjski proces. Potencialno neoplastični kloni celic morajo najprej obiti apoptozo in imunski odziv ter nato »organizirati« lasten dotok krvi, in če je možno, še zasejevati (2). Obstajata dva glavna mehanizma, kako onkogeni virusi sprožijo nastanek raka:

- neposredna onkogeneza, kar pomeni, da virus okuži predhodnike populacije klonskih tumorskih celic in vztraja v tumorskih celicah, in
- posredna onkogeneza, pri kateri pa ni nujno, da virus okuži predhodnike tumorskih celic, ampak ima posreden učinek na celice ali imunski odziv, kar sproži nadaljnje tumorske procese. V tem primeru je zelo težko dokazati vzročno povezavo (3).

Poleg humanih onkogenih virusov, ki jih uvrščamo v družine papilomavirusov, herpesvirusov, flavivirusov, retrovirusov in hepadnavirusov, obstaja še nekaj virusov, ki so onkogeni za poskusne živali, niso pa še epidemiološko povezani z rakom pri človeku. Taki so nekateri adeno- in poliomavirusi (virusa BK in JC). Pri tem se postavlja vprašanje, zakaj so onkogeni za živali, ne pa za človeka. Ali mogoče imunski sistem človeka zavre njihov onkogeni potencial ali pa sta njihovo razmnoževanje in izražanje genov drugačna v naravnem gostitelju kot v poskusni živali? Drugo pomembna dejstvo je, da so nekateri virusi pri ljudeh navzoči v zelo visokem odstotku (prekuženost z virusom Epstein-Barr je 98%), pa vendar navadno ne povzročajo raka; če so vpleteni v nastanek novotvorb, je za to navadno potrebnih nekaj let in splet različnih dejavnikov. Eden od razlogov, da je rak redka posledica virusne okužbe, je to, da samo okužba z virusom ni dovolj za razvoj malignega procesa. Pri nevirusnih malignih obolenjih je potrebnih štiri do šest neodvisnih dogodkov za razvoj obolenja, pri čemer gre v glavnem za mutacije v določenem delu genoma. Okužba s tumorskim virusom predstavlja samo enega ali morda dva koraka v celotni onkogenezi, vendar pa poveča verjetnost za razvoj raka (3).

HERPESVIRUSI IN NJIHOVO ONKOGENO DELOVANJE

Herpesvirusi so pomembni onkogeni virusi. So virusi z ovojnico, ikozaedrično kapsido in dvovijačno DNK. Znanih je več kot 100 različnih herpesvirusov, ki so patogeni za številne živalske vrste. Pri človeku povzroča bolezni vsaj osem herpesvirusov, ki so razdeljeni v tri poddružine:

- **alfaherpesvirusi:** – virus herpes simpleks 1 (HSV-1),
– virus herpes simpleks 2 (HSV-2) in
– virus varičela zoster (VZV).
- **betaherpesvirusi:** – virus citomegalije (CMV),
– človeški herpesvirus 6 (HHV-6) in
– človeški herpesvirus 7 (HHV-7).
- **gamaherpesvirusi:** – virus Epstein-Barr (EBV) in
– človeški herpesvirus 8 (HHV-8) (4).

Med živalskimi onkogenimi herpesvirusi so znani virus Lucke, ki so ga odkrili leta 1934 in povzroča ledvični adenokarcinom pri žabah. Za ta virus je značilno, da je njegova aktivnost v gostiteljevih rakasto spremenjenih celicah odvisna od temperature okolja. Ko je temperatura visoka, se virus ne razmnožuje (neproduktivna okužba), je pa možen nastanek malignih sprememb. Tako so tumorji, ki nastanejo v poletnem času, brez virusa, hitro rastejo, zasevajo in pogosto vodijo v smrt gostitelja. Nižje temperature pa aktivirajo razmnoževanje virusa, kar vodi v celično smrt in s tem v nazadovanje tumorja (2). Pomemben je tudi virus Marekove bolezni, ki povzroča piščančjo nevrolimfomatozo (Marekova bolezen). Marekova bolezen je bila dolgo časa hudo problem za perutninarstvo. Danes jo preprečujejo s cepivom iz živih oslavljenih piščančjih ali puranjih herpesvirusov (4). Drugi pomembni onkogeni živalski herpesvirusi so: *Herpesvirus silvialagus*, ki povzroča limfome pri kuncih, in *Herpesvirusi papio*, *Herpesvirus ateles* in *Herpesvirus saimiri*, ki povzročajo limfome in levkemijo pri opicah (4). Vsi ti spadajo med gamaherpesviruse.

Med človeškimi herpesvirusi povezujejo z rakom EBV, HSV-2 in v novejšem času še CMV, HHV-6 in 8, medtem ko je vloga HHV-7 še vprašljiva (4).

VIRUS EPSTEIN-BARR

Prvi humani onkogeni virus, virus Epstein-Barr (EBV), so odkrili leta 1964 v celicah Burkittovega limfoma. Kasneje so EBV našli tudi v karcinomu nosu in žrela.

EBV je eden izmed najbolj učinkovitih virusov, ki povzročajo celično preobrazbo (3). Povzroča nalezljivo benigno limfadenopatijo, infekcijsko mononukleozo. Za bolezen je značilna proliferacija z virusi okuženih limfocitov B. Domneve o možnem prehodu infekcijske mononukleoze v kakšno od raka-vih limfatičnih bolezni so se izkazale za napačne. Nasprotno je mogoče z veliko verjetnostjo trditi, da je EBV mnogo več kot naključni spremljevalec pri nekaterih malignih tumorjih (5). Tako je povezan s tremi limfoproliferativnimi boleznimi: Burkittovim limfomom, B-limfoproliferativnimi boleznimi v stanjih imunske pomanjkljivosti in z določeno vrsto Hodgkinovega limfoma. Genom EBV so dokazali tudi v različnih malignih spremembah epitelijskih celic, kot so karcinom nosnega žrela, karcinom prebavnega trakta, priželjca, žlez slinavk, nebnic in osrednjega živčevja (2, 5).

EBV v celični liniji P3HR-1, ki izvira iz Burkittovega limfoma, ima delečijo v področju genoma, ki kodira jedrni protein 2 (angl. *Epstein-Barr nuclear antigen* – EBNA 2) in latentni jedrni protein (angl. *Epstein-Barr nuclear antigen-latent protein* – EBNA-LP). Ugotovili so, da EBV iz te linije v celicah, ki jih okuži, ne sproži nesmrtnosti vendar pa se lahko razmnožuje. Iz tega je sledilo spoznanje, da imajo poleg EBNA 2 in EBNA-LP pomembno vlogo v preobrazbi limfocitov B tudi gena, ki kodirata jedrna proteina 3A in 3C (angl. *Epstein-Barr nuclear antigen 3A and 3C* – EBNA 3A, 3C) in gen, ki kodira latentni membranski protein 1 (angl. *latent membrane proteine 1* – LMP 1) (5).

Prva gena EBV, ki se izrazita v procesu malignih transformacij, sta sicer res EBNA 2 in EBNA-LP, vendar tema dvema sledijo drugi geni EBNA, LMP in jedrna poliadenilirana RNK, ki jo kodira virus Epstein-Barr (angl. *Epstein-Barr*

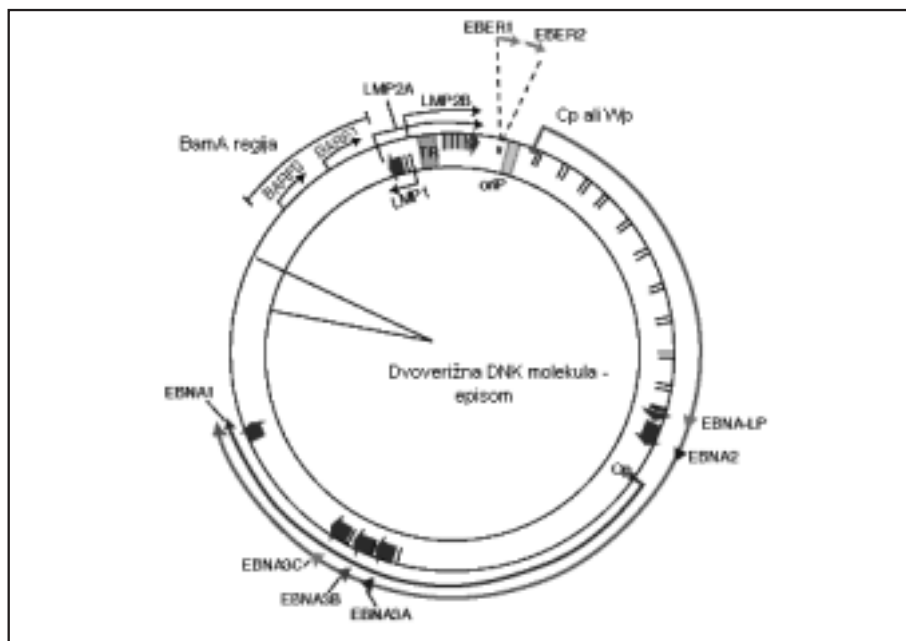
small non-polyadenylated nuclear RNA – EBER) (tabela 1). Da spominske celice B preidejo iz G0 v aktivno fazo G1, je potreben ciklin D2. In prav tu sta pomembna gena EBNA 2 in EBNA-LP, saj s svojimi produkti aktivirata sintezo ciklina D2 in prehod počivajočih celic B v fazo G1 (2,6).

Tabela 1. Celični geni in geni EBV, ki aktivirajo ali zavirajo celično rast (3).

celični geni	geni EBV
Ciklin D2	EBNA 2, EBNA-LP
Bcl-2	LMP-1, EBNA 3B, BHRF1
IL-6	gp340/220
Odpornost na IFN	EBNA 2

Vloga posameznih proteinov, vključenih v nesmrtnost in maligno preobrazbo celic:

- EBNA 1 s svojo vezavo na oriP, ki je mesto začetka razmnoževanja virusa v času latence, omogoča podvojevanje genoma v episomski obliki (slika 1). Oba elementa vsaj posredno vplivata na nesmrtnost, tako da zagotavljata vztrajanje virusnega genoma v okuženi celici (3).
- EBNA 2 je transaktivator prepisovanja in se izrazi takoj po okužbi celic B z EBV. Poleg tega pozitivno regulira prepisovanje (transkripcijo) celičnih genov, ki kodirajo označevalce aktivacije limfocitov B, CD23, B-limfocitni diferenciacijski marker CD21 in celični onkogen *c-fgr* (3).
- LMP pozitivno uravnava celični onkogen *bcl-2*, kar prepreči apoptozo. Karboksilni konec LMP 1 vsebuje dve funkcionalni domeni, C-terminalni aktivirajoči domeni 1 in 2 (angl. *C-terminal activating region* – CTAR 1 in 2). Ti dve domeni reagirata s celičnimi dejavniki, ki se vežejo na receptor za tumor nekrotizirajoče dejavnike (angl. *tumour necrosis factor receptor associated factor* – TRAF), ki so vključeni v prenos signalov, kar aktivira NF- κ B. Poleg tega so TRAF tarče proteinov iz družine receptorjev za tumor nekrotizirajoče dejavnike (angl. *tumour necrosis factor receptor* – TNFR) (CD40, CD30, TNFR1, TNFR2). Danes velja, da LMP 1 posnema ves čas aktivno receptorsko molekulo (3).



Slika 1. Genom EBV v episomski obliki (7).

- EBER in BHRF1 sta sorodna *bcl-2* in preprečujeta apoptozo, za preobrazbo celic B nista potrebna, čeprav zadnje študije kažejo, da eksogeni virusni interlevkin 10 (vIL-10) v času okužbe močno okrepi preobrazbo celic B s tipom 1 in 2 EBV (3).

Vrste novotvorb, pri katerih sodeluje EBV

Burkittov limfom

EBV kot povzročitelja Burkittovega limfoma (BL) je leta 1964 odkril Epstein z gojenjem tumorskih celic bolnikov, ki so zboleli za pogostim B-celičnim limfomom, ki so ga kasneje po Burkittu imenovali Burkittov limfom (5).

Nastanek Burkittovega limfoma kot malignega tumorja je tesno povezan z okužbo z EBV. Ljudje z visokim titrom protiteles proti virusnemu kapsidnemu antigenu (angl. *viral capsid antigen* – VCA) v otroštvu imajo veliko možnost, da zbolijo (1). V celicah BL je genom EBV kot episom (1,2). Vse okužene celice izražajo EBNA 1, večina pa tudi VCA, zgodnji antigen (angl. *early antigen* – EA) in membranski antigen (angl. *membrane antigen* – MA).

Patogeneza BL:

- Večina bolnikov se okuži z EBV zgodaj v otroštvu, virus vztraja v limfocitih B.
- Okužba s povzročiteljem malarije (*Plasmodium sp.*) povzroči imunosupresijo, ki reaktivira EBV. Aktivni virusi okužijo limfocite B, ki živahno proliferirajo.
- V spodbujenih limfocitih B pride do izražanja EBNA 1 z zelo aktivnimi geni *c-myc*. V teh pogojih genetske spremembe nastajajo z večjo frekvenco.
- Pride do recipročne zamenjave gena *c-myc* in gena za imunoglobulin (*Ig*), kar povzroči stalno izražanje *c-myc*. Že dolgo je znano, da imajo celice BL značilne kromosomske nepravilnosti (4,5,8). Gre za lom kromosoma 8 na mestu celičnega onkogenega *c-myc* ali blizu njega (5). Del kromosoma 8 se prenese na kromosom 14, na mesto, ki kodira sintezo težke verige imunoglobulinov ali na kromosomu 22, na mesto, ki kodira lahko verigo. *c-myc* se na novem mestu intenzivneje izrazi in prevzame vlogo onkogenega (5).

Ob teh bistvenih spremembah, ki jih povzroči EBV, pomeni sočasna ali poznejša okužba s plazmodijem in/ali s HIV dodaten

dražljaj za proliferacijo limfocitov B, ki je živahna že po sami okužbi z EBV. Obe dodatni okužbi delujeta zaviralno na celice T (5).

Danes govorimo o treh vrstah BL: o endemskem, neendemskem in o BL, ki nastane pri bolnikih z aidsom. Endemski BL je v osrednji Afriki še danes najpogostejši maligni limfom čeljusti pri dečkih, mlajših od 15 let (incidenca 5–10/100.000/leto) (5). Področje razširjenosti se ujema z razširjenostjo malarije. Zato so dolgo mislili, da BL povzroča virus, ki ga prenašajo komarji (8).

Posamezni neendemski BL se pojavlja v Evropi, Severni in Južni Ameriki ter severni Afriki. Pogostnost je v primerjavi z endemsko obliko 50–100-krat manjša. Navadno se pojavi pri obeh spolih, zbolevalo pa odrasli. Najpogostejše nastane v trebušni votlini, včasih pa tudi v spodnji čeljustnici in ocnici. Tudi pri tej obliki BL so celice genetično spremenjene (5).

V zadnjih desetih letih so prepoznali še tretjo obliko BL, ki se pojavi pri bolnikih z aidsom. Znano je, da so pri teh bolnikih B-celični limfomi precej pogosti. BL je eden od njih. Ko bolezen napreduje, se ta limfom pojavi razmeroma zgodaj, pred popolno odpovedjo imunskega sistema (5).

B-limfoproliferativne bolezni

B-limfoproliferativne bolezni (BLPD) se pojavijo pri več kot 10 % ljudi po presaditvi organov, ki prejemajo imunosupresivna zdravila, redkeje pa tudi pri drugih skupinah imunsko pomanjkljivih oseb. Predispozicijska dejavnika za razvoj bolezni sta visok odmerik imunosupresivnih zdravil in primarna okužba z EBV (2). Tako so seronegativni prejemniki mnogo bolj ogroženi, saj lahko pridobijo okužbo s presadkom ali transfuzijo krvi. Pri seropozitivnih se bolezen redko razvije. Limfom se pojavi v bezgavkah, črevesju, jetrih, osrednjem živčevju, lahko pa tudi na večih mestih hkrati (2,5). Celice tumorjev pri BLPD izražajo vse latentne virusne gene, vključno z znanima virusnima onkogenoma LMP 1. Pomembno vlogo pri rasti tumorja pa naj bi imelo tudi neravnovesje citokinov; zlasti so tu pomembne celice T CD4 in njihovi citokini (IL-2, 4, 6, 10) (2). Prvi ukrep pri zdravljenju limfoma je zmanjšanje odmerkov imunosupresivnega zdravila, nato pa sledita zdravljenje s protitelesi, ki so usmerjena proti površinskim

molekulam (CD 20, 21) in infuzija z EBV senzibiliziranih citotoksičnih limfocitov T (2). Po končanem zdravljenju limfomi navadno izginejo, vendar postane problem zavrnitev organa (5).

Hodgkinov limfom

Hodgkinov limfom (HL) ima značilne patološke, epidemiološke in virološke značilnosti, po katerih ga lahko ločimo od drugih limfomov. Pogost je pri mladih ljudeh. Značilna je bimodalna rastna krivulja, z enim vrhom zgodaj v mladosti in z enim v poznih letih. Osebe, ki so prebolele infekcijsko mononukleozo, imajo 2–3-krat večje tveganje za nastanek HL kot seronegativni posamezniki. Pri bolnikih s HL se navadno ohrani visoka raven protiteles proti EBV (5). V poznih 80. letih so z molekularno diagnostičnimi postopki dokazali, da 80 % Reed-Sternbergovih celic (RSC) HL, ki so obdane z reaktivnimi mononuklearnimi celicami, vsebuje genom EBV. RSC so celice B z mutiranimi geni *Ig*, ki izražajo le LMP 1, LMP 2A, EBNA 1 in EBER, ne pa EBNA 2 (2).

T-celični limfom

DNK EBV so prvič odkrili leta 1988 v T-celičnem limfomu dveh bolnikov z infekcijsko mononukleozo. Od takrat ga povezujejo z različnimi T-limfomi. Celice ponavadi izražajo podobne gene kot celice pri HL: EBER, EBNA 1, LMP 1 in LMP 2A. Izražanje LMP 1 v tumorskih celicah je šibko in zelo heterogeno (2). Povezavo z EBV so dokazali pri treh različnih T-celičnih limfomih: prvi je hemofagocitni sindrom (angl. *virus associated hemophagocytic syndrome* – VAHS), ki ima verjetno več povzročiteljev, v nekaterih primerih je to EBV. Ta limfom se razvije po prvi okužbi z EBV. Njegova posebnost je, da histiociiti fagocitirajo krvne celice. Druga vrsta T-celičnih limfomov, v katerih so ugotovili genom EBV, so limfomi nosne votline, kože in prebavil. Dokazali so jih pri Evropejcih in Azijcih. Genom EBV so dokazali tudi pri tretji vrsti T-celičnih limfomov – pri angioimunoblastni limfadenopatiji (angl. *angioimmunoblastic lymphadenopathy* – AILD) in pri pleomorfnem limfomu s srednje velikimi in velikimi celicami. Ugotovili so, da se delež celic z genomom EBV veča z napredovanjem tumorja (5).

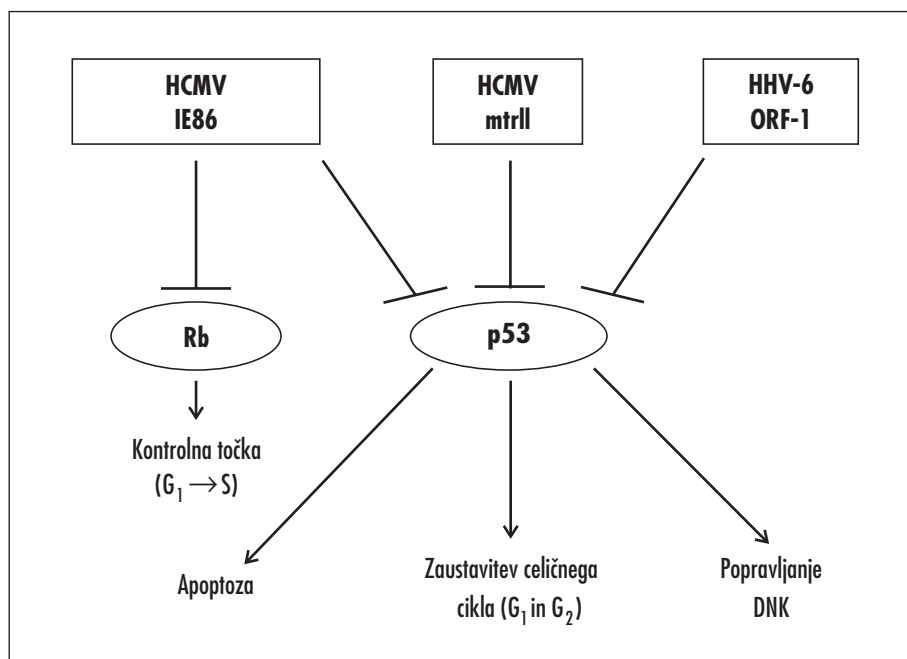
Karcinom nosnega žrela

To je karcinom epitela nosnega žrela, pri čemer so celice genetično spremenjene in izražajo gene EBNA 1, EBER, LMP 1, LMP 2A in B, gen *p53*, ki predstavlja celični naravni varovalni gen, pa ni mutiran (5). Karcinom nosnega žrela (KNŽ) je precej pogost (incidenca je 1/100.000/leto), vendar je najbolj razširjen v jugovzhodni Aziji (5). Povezavo z EBV so odkrili na osnovi seroloških raziskav, saj so imeli bolniki velike vrednosti IgG in IgA proti VCA, proti difuznemu zgodnjemu antigenu (angl. *diffuse early antigen* – EA-D) in EBNA. Napovedni pomen imajo predvsem IgA anti-VCA. Ugotovili so, da ima 1 do 2 % Kitajcev trajno visoko raven protiteles in da se prav pri njih z veliko verjetnostjo pojavi KNŽ (3). Nastanek KNŽ je zapleten proces, pri katerem je virus samo eden od dejavnikov. Drugi pomembni dejavniki, ki so jih proučevali in so pomembni pri razvoju KNŽ, so še specifičnost odseka na kromosomu 6, ki ima zapis za humani levkocitni antigen (HLA), imunski odziv gostitelja, okolje, prehrana ter kemični in fizikalni dražljaji. Ugotovili so, da gen

blizu lokusa HLA ali HLA sam pomembno vpliva na dovzetnost za razvoj KNŽ. Upoštevali so tudi dejavnike okolja in prehrane, saj Kitajci v Ameriki zbolevajo v značilno manjšem številu kot doma, vendar še vedno pogostejše kot pripadniki drugih etničnih skupin. Ugotovili so, da so kemični in fizikalni dražljaji, kot so nitrozamini v slanih ribah, poklici, ki so izpostavljeni dimu in prahu, močan dejavnik ogrožanja (5).

Karcinom prebavnega trakta

Je pogost tumor, ki se pojavlja po vsem svetu. Podatki o povezavi karcinoma z EBV so glede na geografsko območje zelo različni. Povezava z EBV se spreminja tudi glede na histološke tipe karcinoma. Najpogostejše se v povezavi z EBV pojavlja limfoepitelni tip karcinoma želodca, skoraj nikoli pa intestinalni in difuzni tip. V tumorskih celicah najdemo neintegrirano episomsko DNK EBV, ki izraža samo EBNA 1 ali EBNA 1 in LMP 2A. To kaže, da je sorodnejši z BL kot s KNŽ. Pri tej vrsti raka je EBV samo sodejavnik ob okužbi z bakterijo *Helicobacter pylori* in ob genetskih nepravilnostih (2).



Slika 2. Shematski prikaz interakcij proteinov CMV in HHV-6 z gostiteljevimi supresorskimi proteini p53 in Rb (3).

VIRUS HERPES SIMPLEKS 2

Že od leta 1960 virus herpes simpleks 2 (HSV 2) omenjajo kot glavnega povzročitelja invazivnega raka materničnega vratu. Leta 2001 je Sapountzi-Krepia poročal, da je imelo 70 % žensk s cervikalno intraepitelijsko displazijo 3 (CIN 3) že okužbo s HSV 2, kar je potrdilo domnevo o vpletenosti HSV 2 v nastanek raka materničnega vratu (9). Vendar pa še zmeraj ni jasno, ali gre za vzročno povezavo ali le za slučajno vzporedno okužbo (4,9). Pri razvoju raka materničnega vratu, raka sečnega mehurja in malignih spremembah epitela v anogenitalnem področju imajo ključno vlogo sinergistične interakcije med HSV 2, humanim papilomavirusom in HHV-6 (10,11). Pomembno vlogo imajo še genetske osnove, imunski odziv, hormonske spremembe, spolna aktivnost, življenjski stil in drugi dejavniki (4).

VIRUS CITOMEGALIJE

Zaradi velike razširjenosti virusa citomegalije (CMV) je etiološko povezavo med virusom in malignimi obolenji težko določiti. Vendar pa virološke, epidemiološke in molekularne študije kažejo na povezavo CMV z nekaterimi malignimi obolenji, kot so rak materničnega vratu, rak prostate in rak prebavil (9).

Glavno vlogo pri razvoju malignih obolenj, povezanih z CMV, ima gen *mtrII* znotraj odseka genoma ORF 79. Protein MtrII se veže na celični tumor supresorski protein p53. Posledica te interakcije je izguba kontrolnih točk v celičnem ciklu, kar omogoča nekontrolirano razmnoževanje virusne DNK in transformacijo gostiteljske celice (9).

Drug pomemben gen, ki naj bi imel vlogo virusnega transaktivatorja, je takojšnji zgodnji gen (angl. *immediate-early gene* – IE), ki kodira več proteinov. Produkti gena IE delujejo kot transaktivatorji celičnih onkogenov *fos*, *jun* in *myb* (11). Protein IE86 pa reagira tudi s proteinoma p53 in Rb. Interakcije med IE86 in p53 oz. Rb bi lahko vplivale na regulacijo celičnega cikla ter na mehanizme apoptoze in popravljajna poškodovane DNK, vendar pa zaenkrat še ni trdnih dokazov v sistemu *in vivo* (9) (slika 2).

ČLOVEŠKI HERPESVIRUS 6

Kot za druge herpesvire, tudi za človeški herpesvirus 6 (HHV-6) danes velja, da je zelo

razširjen in da do primarne infekcije pride že v prvem letu starosti. Je pomemben patogen ne samo pri razvoju limfoproliferativnih bolezni pri bolnikih z aidsom, ampak tudi kot sodejavniki pri razvoju raka materničnega vratu in ustne votline (12,13). Prav tako so DNK HHV-6 našli v BL, HL in EBV negativnem B-celičnem limfomu (9). Vzročno povezanost HHV-6 z malignimi obolenji nakazujejo naslednja spoznanja:

- tropizem HHV-6 za limfoidne celice,
- indukcija citokinov,
- indukcija CD4 receptorjev,
- pozitivna regulacija izražanja CD4,
- povečana citotoksična moč okuženih limfocitov T,
- *trans*-aktivacija ostalih virusov in
- HHV-6 ima gene za transformacijo (12).

Karcinom materničnega vratu je drugo najpogostejše maligno obolenje pri ženskah. Več kot 90 % karcinomov materničnega vratu vsebuje DNK visoko rizičnih humanih papilomavirusov (HPV), predvsem genotipa HPV 16 in HPV 18. V takšnih tumorjih sta izražena virusna onkoproteina E6 in E7. Okužba s HPV je za nastanek karcinoma materničnega vratu nujna, vendar ne zadostna. Za razvoj malignosti so potrebne tudi celične spremembe, povzročene z eksogenimi agenci, kot so kontracepcija, kajenje, okužba z HSV-2 ali HHV-6. HHV-6 se lahko sprošča iz celic sluznice splovil in je eden od dejavnikov v večstopenskem procesu nastanka raka materničnega vratu, saj lahko poveča izražanje genov E6 in E7 HPV (12).

Pri nastanku malignih sprememb, povezanih s HHV-6, ima pomembno, če ne celo glavno vlogo gen ORF-1, ki ima transaktivacijsko in tudi transformacijsko aktivnost. Poleg tega se veže tudi na p53, to povzroči porušitev normalnega varovanja celic, celice se postopoma maligno preobrazijo (slika 2) (14).

ČLOVEŠKI HERPESVIRUS 7

Človeški herpesvirus 7 (HHV-7) je novejši herpesvirus, izoliran leta 1990 iz limfocitov T CD4. Povzroča predvsem kožne izpuščaje (15). Ker je zelo soroden HHV-6, obstajajo ugibanja, da ima najverjetneje zelo podoben tropizem in da bi lahko povzročal podobne rakave preobrazbe (16). Tako naj bi bil, prav tako kot HHV-6, vključen pri nastanku HL, vendar pa je zelo malo verjetno, da bi bili betaherpesvirusi

sodejavnik pri nastanku HL (16). Obstajajo domneve, da bi lahko povzročal oz. da je vsaj sodejavnik pri razvoju različnih vrst možganskih tumorjev (astrocitom, glioblastom, meningiom) (17).

ČLOVEŠKI HERPESVIRUS 8

Človeški herpesvirus 8 (HHV-8) ali, kot ga tudi imenujemo herpesvirus, povezan s Kaposijevim sarkomom (angl. *Kaposi sarcoma associated herpesvirus* – KSHV), je tesno povezan z razvojem številnih neoplastičnih in malignih obolenj (3,4). Najbolj poznan je Kaposijev sarkom (KS), ki je multifokalna novotvorba kože in ustne sluznice. Obstajajo štiri vrste KS (2):

- klasični KS, ki se pojavlja predvsem pri starejših moških v Evropi in Sredozemlju,
- endemični afriški KS, ki je navadno bolj agresiven kot klasični KS,
- iatrogeni KS, ki se pojavlja po transplantaciji organov in
- KS, povezan z okužbo s HIV, in predstavlja večino KS.

HHV-8 je povezan tudi z multifokalno Castlemanovo boleznijo, kjer gre za hitro rastoč tumor v bezgavkah, angiosarkomom osrednjega živčevja in multiplim mielomom oz. plazmacitomom (18).

Asimptomatski posamezniki imajo HHV-8 v limfocitih B (2). Razvoj bolezni je zelo odvisen od imunske sposobnosti človeka (imunopresija je sodejavnik za razvoj bolezni) (2). Pri nastanku limfoproliferativnih bolezni in malignih transformacij, povezanih s HHV-8, je nenavadno, da virus ne inducira klonov vse do zadnjih faz bolezni (18). To spodbija teorijo o transformirajoči aktivnosti virusa (18).

Čeprav za HHV-8 *in vitro* še niso dokazali, da gre za virus, ki transformira celice, so v njegovem genomu našli številne gene, katerih produkti prekinajo nadzor celičnega cikla (v-Cyc, vGPCR, vIRF), inhibirajo apoptozo (vBcl-2, vMIP-1 β , MIP-II) in nadzorujejo celično rast (vIL-6, vMIP-I, vMIP-II, vMIP-1 β), kar bi lahko pripomoglo k nastanku tumorjev (tabela 2) (3).

Geni HHV-8, ki so pomembni v patogenezi bolezni

Za razliko od EBV, ki aktivira celične gene s svojimi genskimi produkti, ima HHV-8 lastne gene, ki so homologi celičnim.

Geni, ki regulirajo celični cikel

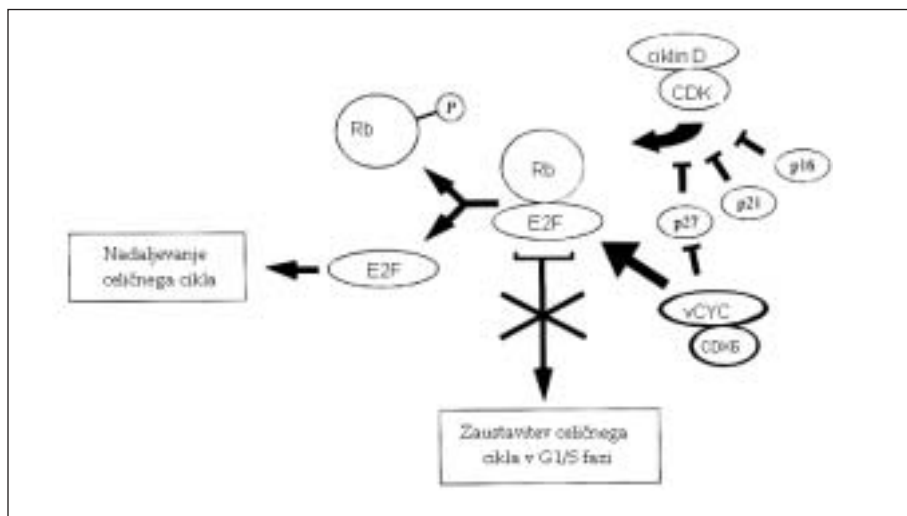
HHV-8 kodira gen za ciklin (*v-cyc*), katerega protein je zelo soroden ciklinu D. Odgovoren je za interakcije s CDK. Celični ciklini so regulatorni deli CDK in so pomembni pri fosforilaciji komponent, ki sodelujejo pri uravnavanju celičnega cikla. Ciklin D je izražen v fazah G1 in S. Skupaj s CDK se usmerita na beljakovino, ki jo kodira gen *Rb*. Fosforilacija *Rb* zaustavi njegovo zaviralno aktivnost na dejavnike prepisovanja, kot je E2F, ki uravnava sintezo DNK. Z zaviranjem *Rb* ciklini omogočijo prehod celičnega cikla iz faze G1 v S in prepisovanje genov, ki kodirajo encime za sintezo DNK.

Podobno deluje virusni *v-cyc*. Največkrat se poveže s CDK6, redkeje pa s CDK4 in 5. Posledica te interakcije je hiperfosforilacija *Rb*, kar povzroča neučinkovit nadzor celičnega cikla.

Poleg tega pa *v-cyc* usmerijo tudi fosforilacijo v histon H1, ki ni normalen substrat za ciklin D, ampak bolj za druge cikline, kot je npr. ciklin A-CDK2. To pa je lahko povezano tudi s tem, da *v-cyc* ne nadzoruje samo celičnega cikla v fazah G1 in S, ampak tudi v kakšni drugi fazi (2). Pri tem je pomembno dejstvo, da je *v-cyc* odporen na delovanje zaviralcev CDK (CDKI), vključno s proteini p16, p21 in p27 (slika 3) (2).

Geni, ki sodelujejo pri apoptozi

Sprožitev apoptoze je tipičen odgovor celice na virusno okužbo. Nepravilno uravnavanje celičnega cikla gostitelja zaradi virusnih proteinov povzroči pozitivno regulacijo tumor supresorske beljakovine p53 in s tem oviranje apoptoze. Po okužbi celice s HHV-8 mehanizmi, ki preprečijo apoptozo, niso konstantno izraženi, zato do preprečitve apoptoze pride v določenih celicah, v določeni fazi virusnega cikla (2). Beljakovina p53 pa aktivira gene, katerih produkti aktivirajo apoptozo (proteina Bax in Bik). Poleg tega p53 pozitivno regulira tudi izražanje CD95 (Fas, Apo-1), ki skupaj z ligandom CD95L (FasL) sporoča celici, da gre v apoptozo. Beljakovina gena *v-bcl-2*, ki se veže in inaktivira Bax, tako prepreči apoptozo. Ta virusna beljakovina je podobna celični Bcl-2.



Slika 3. Delovanje v-cyc na celični cikel (3).

Kemokini in citokini

Za virusno preživetje in razmnoževanje je izredno pomembno, da virus uide prirojenim in pridobljenim mehanizmom imunosti. Med prirojenimi mehanizmi imunosti, ki so pomembni v boju proti virusom, je zelo pomemben interferon (IFN), ki deluje nespecifično, tako da zmanjša virusno razmnoževanje. Pridobljeni imunski odgovor vključuje citokine limfocitov, kot je IL-6 (2). Za humani IL-6 je že dolgo znano, da ima pomembno vlogo v patogenezi KS, Castelmanove bolezni in primarnega (efuzijskega) limfoma, saj spodbuja rast okuženih celic. Homolog IL-6 so našli tudi v HHV-8 (vIL-6). Poleg tega so v genomu HHV-8 identificirali gene, ki kodirajo proteine,

ki delujejo kot kemoatraktanti in promotorji angiogeneze (Orfs K4, K6, K4.1). Pri tem sta dva proteina homologna humanemu makrofagnemu vnetnemu proteinu (MIP-1 β), eden pa MIP-2 in tudi proteinu, ki deluje kot kemoatraktant za makrofage (3).

Pomembna skupina dejavnikov, ki sodelujejo pri prepisovanju virusne DNK, so dejavniki, ki kontrolirajo izražanje genov kot odgovor na IFN (angl. *interferon regulatorni faktor* – IRF). HHV-8 ima homolog IRF, to je vIRF. vIRF prepreči prepisovanje genov, ki se izražajo kot odgovor na IFN, negativno kontrolira p21 in prepreči z IFN sproženo zaustavitev rasti. Torej vIRF v glavnem deluje kot transkripcijski represor (2).

Tabela 2. Geni HHV-8, ki so vključeni v nastanek tumorjev (3).

Homologi v gostiteljski celici	Proteini, ki jih kodira HHV-8	Funkcija
Ciklin D	v-Cyc	Inaktivacija pRB, omogoči prehod iz faze G1 v S
IL-8 GPCR	v-GPCR	Signal za celično rast
CC-kemokini	V-MIP1, 2, 1 β	Kemoatraktant, angiogeneza
IL-6	v-IL-6	Rastni dejavnik za celice KS
Družina Bcl-2 proteinov	v-Bcl-2	Inhibicija apoptoze
FLICE – inhibitorni protein	v-FLIP	Inhibicija CD59L in apoptoze, ki jo povzroči TNF
Družina proteinov N-CAM	v-Ox-2	Celična adhezijska molekula
CD21/CR2 komplemenčni vezavni protein	Orf4	Možnost, da virus uide imunskemu odgovoru
Interferon regulatorni dejavnik	v-IRF	Inhibicija p21 in izražanje MHC1

ZAKLJUČEK

Na koncu lahko ugotovimo, da so virusi analogni drugim mutagenim karcinogenom, saj so vsi sposobni sprožiti verigo dogodkov, ki vodijo v malignost. Navadno imajo virusi vlogo sodejavnikov (2).

Razvoj znanosti na tem področju je hiter. V prihodnosti bo na voljo več točnih informacij o vlogi posameznih virusov pri nastanku novotvorb. Poleg tega pa je danes veliko raziskav usmerjenih v razvoj cepiv, ki bi

preprečile nastanek malignih obolenj, povezanih z infekcijo z virusi. Tako je v teku preiskušanje plazmida, ki vsebuje gen EBNA 1, mesto oriP in gen za timidinsko kinazo. Ob vezavi EBNA 1 na oriP naj bi prišlo do aktivacije gena za timidinsko kinazo, s čimer bi celice postale občutljive na ganciklovir. To je le ena od možnih poti v boju proti malignim obolenjem, ki jih povzroča EBV. Glede vloge drugih herpesvirusov pri nastanku novotvorb pa bo odločilno vlogo odigral čas.

LITERATURA

- White DO. Mechanisms of viral oncogenesis. In: White DO, Fenner FJ. *Medical Virology*. San Diego: Academic Press; 1994. p. 170–90.
- Epstein MA, Rickinson AB, Weiss RA. Oncogenic γ -herpesviruses: an expanding family. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001; 356 (1408): 409–604.
- Arrand JR, Harper DR: *Viruses and human cancer*. Oxford: BIOS Scientific publishers; 1998. 1–107.
- Koren S. Virusna onkogeneza. In: Koren S, Avšič ŽT, Drinovec B, Marin J, Poljak M. *Splošna medicinska virologija*. Ljubljana: Medicinski razgledi; 1998. p. 65–78.
- Marin J. Povezanost med okužbo s herpesvirusi in nastankom neoplazem pri ljudeh. *Zdrav vestn* 1999; 68: 309–12.
- Bishop JM. Viral oncogenes. *Cell* 1985; 42: 23–38.
- Murray PG, Lawrence SY. The Epstein-Barr virus genome. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2001; 1: 14–16.
- Farrel PJ, Cludts I, Stuhler A. Epstein-Barr virus genes and cancer cells. *Biomed Pharmacother* 1997; 51: 258–67.
- Sapountzi-Krepia D, Roupia Z, Biniotis S, Tsirintani M, Darivakis S, Frangakis G, et al. Cervical intraepithelial dysplasia (CIN 3) and history of herpes genitalis (HSV 2) in women living in Attica, Greece. *In Vivo* 2001; 15; 6: 525–28.
- Persing DH, Prendergast FG. Infection, immunity and cancer. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123: 1015–22.
- Gazzaniga P, Vercillo R, Gradilone A, Silvestri I, Gandini O, Napolitano M, et al. Prevalence of papillomavirus, Epstein-Barr virus, cytomegalovirus and herpes simplex virus type 2 in urinary bladder cancer. *J Med Virol* 1998; 55: 262–7.
- Ablashi DV, Berbaum J, DiPaao JA. Human herpesvirus 6 as a potential copathogen. *Trends Microbiol* 1995; 3; 8: 324–7.
- Marin J. Človeški herpesvirus 6. *Zdrav Vestn* 2003; 72: 91–5.
- Doniger J, Muralidhar S, Rosenthal LJ. Human cytomegalovirus and human herpesvirus 6 genes that transform and transactivate. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 367–82.
- Torigoe S, Kumamota T, Koide W, Taya K, Yamanishi K. Clinical manifestations associated with human herpesvirus 7 infection. *Arch Dis Child* 1995; 72: 518–9.
- Chan PK, Chan MY, Li WW, Chan DP, Cheung JK, Cheng AF. Association of human beta-herpesviruses with the development of cervical cancer: bystanders or cofactors. *J Clin Pathol* 2001; 54: 48–53.
- Chan PK, Ng HK, Cheng AF. Detection of human herpesviruses 6 and 7 genome sequences in brain tumours. *J Clin Pathol* 1999; 52: 620–3.
- Schatz O, Goebel FD. The role of human herpesvirus 8 (HHV-8) as a carcinogen. *Biotech Bulletin* 2000; 6: 195–206.
- Schmidt CA, Oettle H, Peng R, Binder T, Wilborn F, Huhn D, et al. Presence of human beta and gamma-herpes virus DNA in Hodgkins disease. *Leuk Res* 2000; 24: 865–70.
- Chan P, Ng H, Hui M, Ip M, Cheung J, Cheng A. Presence of human herpesviruses 6, 7 and 8 DNA sequences in normal brain tissue. *J Med Virol* 1999; 59: 491–5.
- Lacoste V, Kadyrova E, Chistiakova I, Gurtsevitch V, Judde JG, Gessain A. Molecular characterization of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus – 8 strains in Russia. *J Gen Virol* 2000; 81: 1217–22.
- Kennedy MM, Biddolph S, Lucas SB, Howells DD, Picton S, McGee J, et al. Cyclin D1 expression and HHV8 in Kaposi sarcoma. *J Clin Pathol* 1999; 52: 569–73.
- Pierrotti LC, Sumita LM, Freire WS, Filho HHC, Fick de Souza VAU. Detection of human herpesvirus 8 DNA and antibodies to latent nuclear and lytic-phase antigens in serial samples from aids patients with Kaposi sarcoma. *J Clin Virol* 2000; 16: 247–51.
- Strand K, Harper E, Thormahlen S, Thouless ME, Tsai C, Rose T, Bosch M. Two distinct lineages of macaque gamma herpesviruses related to the Kaposi's sarcoma associated herpesvirus. *J Clin Virol* 2000; 16: 253–69.

25. Mendez JC, Procop GW, Espy MJ, Paya CV, Smith TF. Detection and semiquantitative analysis of human herpesvirus 8 DNA in specimens from patients with Kaposi's sarcoma. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2220-2.
26. Poljački M, Đuran V, Matić M, Gajinov Z., Stojanović S, Vranješ N. Disseminated classic Kaposi sarcoma associated with human herpesvirus 8 infection. *Acta Derm Vener* 2001; 10: 93-8.
27. Klussmann JP, Muller A, Wagner M, Guntinas-Lichius O, Jungehuelsing M, Sloots T, et al. Human herpesvirus type 8 in salivary gland tumors. *J Clin Virol* 2000; 16: 239-46.
28. Goldenberg D, Golz A, Netzer A, Rosenblatt E, Rachmiel A, Goldenberg RF, et al. Epstein-Barr Virus and cancers of the head and neck. *Am J Otolaryngol* 2001; 22: 197-205.
29. Keeler CL, Kamil J, Kung HJ, Roizman B, Ward PL, Osterrieder N, et al. Herpesviridae. In: Tidona CA, Darai G. *The Springer index of viruses*. Germany Library of Congress Cataloging; 2002. p. 380-448.

Prispelo 25. 10. 2002