

Molekularne mechanizmy onkogenezy wirusowej u ludzi i zwierząt

ALEKSANDRA WOJTALA, MAREK NIEMIAŁTOWSKI

Zakład Immunologii Katedry Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW,
ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Wojtala A., Niemiałtowski M.

Molecular mechanisms of viral oncogenesis in humans and animals

Summary

Tumors are one of the most important health problems for man and animals in the context of human health protection and food hygiene. It is well known that cancer diseases depend on genetic background and subtle molecular regulation of cell division and can be induced by three groups of carcinogens: biological (i.e. some viruses known as oncogenic viruses), physical and chemical. To date more than 50 various DNA (i.e. herpesviruses, adenoviruses, papillomaviruses and polyomaviruses) and RNA (retroviruses) viruses have been well documented as oncogenic viruses. Viruses (i.e. oncogenic herpesviruses and retroviruses) have evolved long-term survival strategies (latency) in the infected host. In the 1970s oncogen v-src of Rous sarcoma virus (RSV) were identified as a factor that can transform the cells of an infected host. At present we know more than 100 viral oncogenes (v-jun) and antioncogenes (tumor-suppressor genes), that compete in cancer induction or suppression, respectively. In contrast normal growth promoting genes (the host genes termed protooncogenes, c-jun: i.e. growth factors, growth factor receptors and transcriptional factors) have been identified. Thus viral carcinogens can trigger oncogenesis by indirect (i.e. induction of immunosuppression in the case of Kaposi's sarcoma in HIV⁺/AIDS⁺ patients or by modification of host cell genome) or direct (i.e. altering the expression of host cell proteins at the point of viral DNA integration) mechanisms. Different molecular models of the replication of DNA and RNA viruses are essential for oncogenesis development in the infected cells and can influence the frequency of cancer induction. In contrast to RNA viral carcinogens DNA viruses are less efficient in tumor induction because the progeny of RNA viruses are continually being released from the virally transformed cells. In this paper the molecular mechanisms of viral oncogenesis in the context of human (EBV, HPV, HCV, HTLV-1) or animal (RSV, AMV, MDV) viruses is briefly described and discussed.

Keywords: human and animal oncogenic viruses, oncogenesis

Doskonale wiadomo, że nie tylko czynniki fizyczne i chemiczne, ale również biologiczne (np. wirusy) mogą indukować powstawanie nowotworów u ludzi i zwierząt. W 1911 r. Peyton Rous odkrył, że wirusy są zdolne do przeprowadzenia transformacji nowotworowej, powodując powstanie mięsaka u drobiu. Wirus ten został nazwany wirusem mięsaka Rousa (RSV, Rous sarcoma virus) – za to odkrycie P. Rous został wyróżniony Nagrodą Nobla dopiero w 1966 r. (9), na krótko przed śmiercią w 1970 r. w wieku 91 lat. W niniejszym opracowaniu opisano – na wybranych przykładach (tab. 1) – wirusy onkogenne występujące u ludzi (EBV, HPV, HCV, HTLV-1) i u zwierząt (RSV, AMV, MDV) oraz molekularne mechanizmy onkogenezy wirusowej.

Jednym z licznych podziałów wirusów jest ich podział na 4 kategorie w oparciu o klasyfikację epidemiologiczną i rodzaj transmisji wirusa w zakażonym

organizmie, to jest: (i) wirusy enterotropowe, jak z rodzin: *Adenoviridae*, *Picornaviridae*, *Reoviridae*, *Astroviridae* i *Caliciviridae*, (ii) wirusy mające powinowactwo do układu oddechowego, jak z rodzin: *Adenoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Coronaviridae* i *Picornaviridae*, (iii) arbowirusy (arthropod-borne viruses), jak wirusy z rodzin: *Reoviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae* i *Bunyaviridae* oraz (iv) wirusy onkogenne, jak wirusy z rodzin: *Adenoviridae*, *Herpesviridae*, *Papovaviridae*, *Hepadnaviridae* i *Retroviridae*. Szacuje się, że około 20% chorób nowotworowych u ludzi na świecie jest indukowane przez wirusy i inne czynniki zakaźne. Dotyczy to ponad 1,8 milionów nowych przypadków nowotworów rocznie (dane epidemiologiczne z 2008 r.) (22, 33). Do klasycznych wirusów onkogennych zaliczamy zarówno wirusy DNA (z rodzin: *Adenoviridae*, *Herpesviridae*, *Hepadnaviridae*, *Papovaviridae*), jak i wirusy RNA

Tab. 1. Charakterystyka wybranych właściwości biologicznych niektórych wirusów wywołujących choroby nowotworowe u ludzi i zwierząt

Wirus	HPV	EBV	HTLV-1	HCV	RSV	AMV	MDV
Rodzaj kwasu nukleinowego	DNA	DNA	RNA	RNA	RNA	RNA	DNA
Wielkość genomu	8000 pz	172 kb	10 000 pz	9400 pz	10 kb	7,7 kb	166-184 kb
Jedno- lub dwuniciowość DNA lub RNA	2-niciowy	2-niciowy	1-niciowy	1-niciowy	1-niciowy	1-niciowy	2-niciowy
Liniowość lub kolistość DNA lub RNA	kolisty	liniowy	liniowy	liniowy	liniowy	liniowy	liniowy
Morfologia kapsydu	kubiczny, Ø 55 nm	ikosaedralny, Ø 100-110 nm	ikosaedralny, Ø 100 nm	ikosaedralny, Ø 40-60 nm	ikosaedralny, Ø 100 nm	ikosaedralny, Ø 100 nm	ikosaedralny, Ø 85-100 nm
Zakres wrażliwych na zakażenie gospodarzy	ludzie	ludzie	ludzie	ludzie	drób, małpy, myszy, szczury, świnki morskie, chomiki	drób	drób
Sposób przenoszenia wirusa w środowisku naturalnym	uszkodzona skóra, drogą płciową	drogą kropelkową	krew, drogą płciową	krew, drogą płciową	drogą oddechową lub pokarmową	drogą oddechową lub pokarmową	drogą oddechową lub pokarmową
Rozmieszczenie geograficzne	cały świat	cały świat	cały świat	cały świat	cały świat	cały świat	cały świat
Tropizm tkankowy	komórki nabłonka skóry oraz błon śluzowych	limfocyty B	limfocyty T CD4 ⁺	hepatocyty, limfocyty B	tkanka łączna i mięśniowa	makrofagi	limfocyty T

Objaśnienia: wirus brodawczaka ludzkiego (HPV); wirus Epsteina-Barr (EBV); ludzki wirus białaczki limfocytów T typu I (HTLV-I); wirus zapalenia wątroby typu C (HCV); wirus mięsaka Rousa (RSV); wirus ptasiej mieloblastozy (AMV); wirus choroby Mareka (MDV)

(z rodziny *Retroviridae*). Wirusy onkogenne charakteryzują zdolność do immortalizacji zakażonych komórek, co powoduje ich niekontrolowany wzrost i transformację nowotworową. Do materiału genetycznego zakażonej komórki może wbudować się cały genom wirusa lub jego część. Prowadzi to do zaburzenia w podziale i funkcjonowaniu tych komórek, jak również może modyfikować swoistość antygenową wirusa, a zakażone komórki nabywają cech komórek nowotworowych. Aby uznać wirusy za czynniki karcinogenne, muszą być spełnione następujące warunki (5):

- genom wirusa lub jego antygeny są obecne w tkance objętej chorobą;
- wirus jest zdolny do wywoływania transformacji nowotworowej komórek w warunkach laboratoryjnych *in vitro*;
- istnieje dowód epidemiologiczny, że zakażenie wirusowe jest istotnym czynnikiem stymulującym rozwój nowotworu.

Wirusy wywołujące nowotwory u ludzi

Wirus brodawczaka ludzkiego (Human Papilloma Virus, HPV). HPV (rodzina *Papillomaviridae*) obejmuje dużą grupę wirusów, do której należy ponad 100 zidentyfikowanych typów. Można wyróżnić HPV „wysokiego ryzyka” ze względu na ich epidemiologiczne powiązanie z nowotworami złośliwymi, do których należą typy: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 i 68. Natomiast drugą grupą są wirusy o stosunkowo niskim ryzyku pod względem onkogenności, do której to grupy należą typy: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 i 81 (5, 21). Pozostałe typy HPV nie stanowią istotnego, jak się wydaje, zagrożenia dla zdrowia,

lecz indukują powstanie brodawek skórnych stosunkowo łatwych do wyleczenia. Onkogenne HPV kodują co najmniej 3 białka o właściwościach transformujących (E5, E6, E7). Białko E5 nie jest wymagane do powstania i podtrzymania „złośliwego” fenotypu komórek, a jedynie odgrywa istotną rolę we wczesnej indukcji wzrostu zakażonych komórek (36). Dwa inne białka, E6 i E7, posiadają zdolność immortalizacji komórek. Białka te współdziałają z różnymi innymi białkami kodowanymi przez geny supresorowe i onkogeny.

Opisano różne interakcje pomiędzy białkiem E6 a białkami komórek gospodarza. Najważniejszą z nich jest powiązanie E6 z białkiem p53, co prowadzi do jego degradacji i inicjacji onkogenezy (26). HPV wykształcił szereg mechanizmów, za pomocą których blokuje białko p53. Najlepiej poznany mechanizm jest połączenie białek E6 z p53 za pośrednictwem białka E6-AP (E6 associated protein). E6-AP jako ligaza degraduje białko p53 w układzie ubikwityna-proteosom (9, 14, 36). Drugim proponowanym mechanizmem jest zatrzymanie białka p53 w cytoplazmie przez maskowanie sygnałów lokalizacji jądrowej (NLS, nuclear localization signal) na C-końcu białka p53 (spowodowane przyłączeniem się proteiny E6). Białko p53 funkcjonuje w jądrze komórki jako czynnik transkrypcyjny, natomiast będąc w cytoplazmie nie ma możliwości regulacji ekspresji genów. Trzeci mechanizm jest związany z oddziaływaniem białka E6 na acetylotransferazy histonów. Enzymy te, acetylując histony, umożliwiają łatwiejszy dostęp p53 do promotorów, w związku z czym proces aktywacji ekspresji genów zachodzi znacznie szybciej. Połączenie onkogenego białka z takim enzymem uniemożliwia acetylację (14). On-

kogenne właściwości białka E6 można również zauważyć w modulowaniu transkrypcji genów, których produkty białkowe są zaangażowane w mechanizmy efektorowe odporności wrodzonej gospodarza. E6 oddziałuje na dwa białka będące częścią wrodzonego układu immunologicznego i zaangażowane w zwalczanie zakażeń wirusowych – są to: czynnik IRF-3 (interferon regulatory factor-3) regulujący aktywność IFN i TLR-9 (Toll-like receptor 9). IRF-3 jest aktywowany przez zakażenie wirusem lub ds-RNA, co prowadzi do transkrypcji IFN- β . E6, oddziałując na IRF-3, hamuje jego transkrypcję i zapobiega indukcji IFN- β (5, 28). TLR-9 zostaje aktywowane przez ds-DNA wirusowe i bakteryjne, rozpoczynając produkcję cytokin, natomiast ekspresja onkogenów E6 i E7 „wycisza” transkrypcję TLR-9 (14). Ponadto białko E6 wpływa na degradację proapoptotycznego białka Bak (z rodziny białek Bcl-2), czego wynikiem jest zablokowanie apoptozy i immortalizacja komórek (35).

Z kolei produkt genu E7 oddziałuje na białko pRb, będące, oprócz białka p53, kluczowym regulatorem cyklu komórkowego w fazie G1. W komórkach będących w fazie spoczynku białko pRb połączone jest z jądrowym czynnikiem transkrypcyjnym E2F, co wpływa na inaktywację tego ostatniego. Skutkuje to zatrzymaniem cyklu komórkowego i brakiem możliwości jego przejścia do fazy S. Białko E7, łącząc się z białkiem pRb, uwalnia jednocześnie czynnik transkrypcyjny E2F, który promuje ekspresję genów niezbędnych do syntezy komórkowego DNA, odblokowując cykl komórkowy (9, 20). Istnieją także inne mechanizmy, w których uczestniczy białko E7, deregulując cykl komórkowy, np. przez stymulację kinaz cyklicznych (Cdk-Cyclin dependent kinases). Białko E7 stymuluje cyklinę A i cyklinę E, przyczyniając się do niekontrolowanej proliferacji komórek. Proteina wirusowa dezaktywuje jednocześnie inhibitory kinaz cyklicznych, takich jak p21 i p27, które w normalnych warunkach indukują sygnały antyproliferacyjne (włączając w to aktywację białka p53) (20). Dodatkowo, ekspresja genu E7 wzmacnia integrację wirusowego DNA z genomem komórek atakowanego organizmu, czego wynikiem jest wzmożona mutagenesa (34). Obydwa białka onkogenne E6 i E7 wykazują synergizm działania w karcinogenezie – razem aktywują telomerazę, enzym, który zapewnia nieśmiertelność komórkom nowotworowym (9).

Wirus Epsteina-Barr (Epstein-Barr Virus, EBV). Zaszeregowany do rodziny *Herpesviridae* wirus Epsteina-Barr (ludzki herpeswirus 4 [HHV-4, Human Herpesvirus-4]) jest pierwszym wirusem onkogenym wykrytym w 1964 r. przez naukowców angielskich Sir Michaela A. Epsteina i Yvonne Barr w komórkach nowotworowych człowieka. Wirusy należące do tej rodziny charakteryzują się zdolnością do przebywania w komórkach gospodarza w stanie utajenia. Wirus wykazuje tropizm przede wszystkim do limfocytów B, w których, w postaci episomu, ustala trwające całe

życie zakażenie latentne. EBV może być przyczyną mononukleozy zakaźnej (*mononucleosis infectiosa*), chłoniaka Burkitta występującego w Afryce Równikowej oraz ewentualnym czynnikiem etiologicznym zespołu przewlekłego zmęczenia i depresji (chroniczny zespół Epsteina-Barr, CEBV) (5, 12).

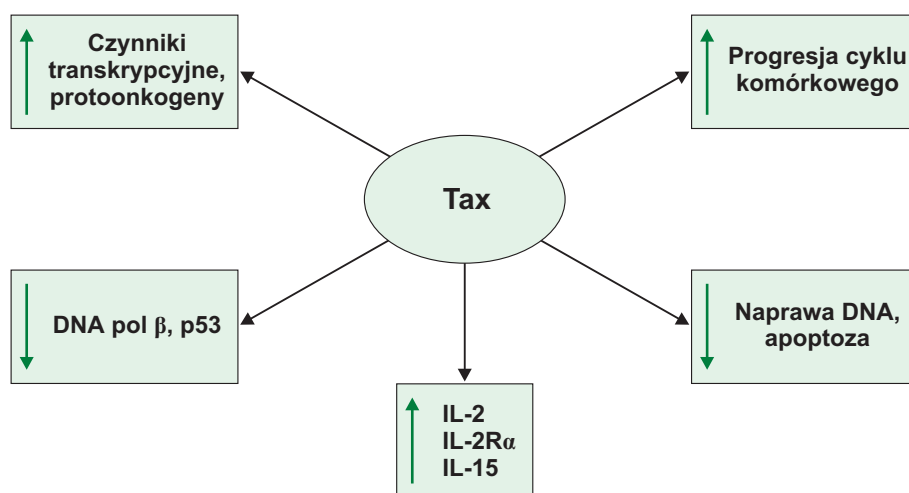
Pierwotne zakażenie EBV zazwyczaj występuje bezobjawowo. U pacjentów powyżej 10. roku życia zakażenie powoduje w około 50% przypadków objawy klasycznej mononukleozy zakaźnej. U osób immunokompetentnych zazwyczaj dochodzi do wyzdrowienia. Natomiast w przypadku supresji komórkowych i/lub molekularnych mechanizmów efektorowych układu odpornościowego dochodzi do reaktywacji zakażenia utajonego, w którym biorą udział różne białka wirusa. W skład białek cyklu utajonego wchodzi sześć białek jądrowych: EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C, -LP (Epstein-Barr Nuclear Antigen) oraz trzy białka membranowe: LMP-1, -2A, -2B (Latent Membrane Protein). Ponadto, podczas latencji nadmiernej ekspresji ulegają małe fragmenty RNA: EBER-1, -2 (Epstein-Barr Early Receptor) (3, 30).

Wykazano ścisły związek między blastogenezą limfocytów B a onkogenezą. Głównym białkiem transformującym, zachowującym się jak klasyczny onkogen, jest białko LMP-1. Jest ono niezbędne do przeprowadzenia transformacji komórek B i komórek epitelialnych, atakowanych przez EBV. Ekspresja genu LMP-1 daje efekt plejotropowy i skutkuje: aktywacją antygenów, rozregulowaniem antyapoptotycznych białek oraz produkcją cytokin (3). Funkcjonalnie LMP-1 przypomina receptor CD40, należący do rodziny receptorów TNF (TNF-R), tworząc kompleks z TRAFs (TNFR-associated factors) oraz z TRADD. TNF-R występuje w dwóch odmianach, każda z nich stymuluje inny rodzaj białek, wywołując przeciwstawny efekt komórkowy: proliferację (receptor p75) i apoptozę (receptor p55). Białko LMP-1 łącząc się z TRAFs (połączony z fragmentami receptora p75) aktywuje antyapoptotyczne czynniki transkrypcyjne, jakimi są: jądrowy czynnik kappa (κ) B (NF- κ B, nuclear factor κ B), białko aktywatorowe AP-1 (activating protein 1) oraz STAT-1 wpływający na proliferację zakażonych limfocytów (26). Rolę w procesie onkogenezy pełni także proteina BHFR-1 oraz EBNA-2. Białko BHFR-1 jest homologiem onkogeny Bcl-2 i bierze udział w hamowaniu apoptozy (3, 26). Z kolei proteina EBNA-2 jest niezbędna do immortalizacji limfocytów B. Białko EBNA-2 razem z EBNA-LP pobudza bezpośrednio transkrypcję komórkowego protoonkogeny c-myc. Proteina ta wzmacnia również transkrypcję innych genów komórkowych (CD21 i CD23), jak i wirusowych (LMP-1, LMP-2A i LMP-2B) (3, 26, 30, 32). Produkt genu latentnego EBNA-1 również wpływa na limfocyty B, warunkując ich przeżycie. Proteina koduje fragmenty tripletów aminokwasowych gly-gly-ala, które zapewniają ochronę przed degradacją wirusa, co w konsekwencji blokuje prezentację antygenów wiru-

sowych przez APC efektorowym cytotoksycznym limfocytom T (CTL) CD8⁺ współdziałającymi z białkami MHC klasy I (32).

Ludzki wirus białaczki limfocytów T typu I (Human T cell leukemia virus type I, HTLV-I). HTLV-I (rodzina *Retroviridae*) wykazuje odmienny mechanizm indukcji onkogenezy niż inne renowirusy. Wirus ten nie posiada własnego onkogenu, natomiast kluczową rolę w transformacji nowotworowej przypisuje się białku tax – 40-kDa, fosfoproteinie kodowanej przez gen znajdujący się w regionie pX genomu prowirusowego. Poza funkcją regulującą ekspresję genów, tax, oddziałując z komórkowymi czynnikami transkrypcyjnymi i cząsteczkami sygnałowymi, wzmacnia lub wycisza, ekspresję genów komórkowych. Białko to wpływa na ekspresję kilku czynników transkrypcyjnych, co przyczynia się do zmiany z produktywnej replikacji wirusa do transformacji komórkowej obserwowanej w białaczce T-komórkowej/chłoniaku u osób dorosłych (ATLL, adult T-cell leukemia/lymphoma) (2).

Białko tax aktywuje promotory genów komórek gospodarza istotne dla rozwoju i proliferacji komórek, włączając w to: (i) czynnik stymulujący kolonie granulocytarno-makrofagowe (GM-CSF), (ii) czynnik martwicy nowotworów- α (TNF- α), (iii) interleukinę 15 (IL-15), (iv) interleukinę 2 (IL-2) i (v) łańcuch α receptora dla IL-2 (IL-2R α) (2). Efektem nadekspresji promotorów tych genów jest stymulacja proliferacji komórek białaczkowych. Wytwarzanie zarówno IL-2, jak i receptora dla niej przez komórki nowotworowe, powoduje ich pobudzenie przy użyciu szlaku autokrynowego (wytworzona cytokina oddziałuje na komórki ją wytwarzające). Jednocześnie aktywowany jest szlak parakrynowy (uwolniona z komórki cytokina wpływa na komórki sąsiadujące) jako wynik ekspresji genów GM-CSF. Działając na makrofagi, czynnik ten indukuje zwiększone wydzielanie innych miogenów komórkowych przez limfocyty T, np. IL-1. Nadmiernie proliferujące limfocyty T powodują zwiększenie ryzyka mutacji, co prowadzi do rozrostu nowotworowego monoklonalnej populacji limfocytów T CD4⁺. Ponadto białko tax indukuje ekspresję protoonkogenów: c-fos, c-myc, erg-1, erg-2, co przyczynia się do rozwoju komórek nowotworowych (13, 26). IL-2R α wykazuje stałą ekspresję we wszystkich komórkach zakażonych wirusem. Promotor regionu kodującego gen dla IL-2R α zawiera motyw dla NF- κ B, a transaktywacja genu IL-2R α przez białko tax następuje za pomocą motywu NF- κ B. Czynnik ten jest zazwyczaj zatrzymywany w cytoplazmie komórki wskutek interakcji z cząsteczką I κ B (inhibitor NF- κ B). Białka HTLV-1 mogą blokować ten proces, umożliwiając NF-



Ryc. 1. Najważniejsze funkcje białka tax (wg 2)

- κ B transport do jądra, co prowadzi do aktywacji promotora genu IL-2R α (25). Niektóre właściwości białka tax przedstawiono na ryc. 1.

Zaobserwowana została również represja genu β -polimerazy przez białko tax, co jest związane z naprawą błędów i uszkodzeń w DNA. Takie zaburzenia są wynikiem często obserwowanej mutacji w genie p53. Nierzadkie są również przypadki translokacji na chromosomie 14 i strukturalnych aberracji na chromosomie 6 u pacjentów z rozwiniętą ATLL (13, 27).

Wirus zapalenia wątroby typu C (HCV, Hepatitis C Virus). Wirusowe zapalenie wątroby wywołane przez HCV (rodzina *Flaviviridae*) stanowi jeden z najpoważniejszych problemów współczesnej medycyny zakażeń. Wirus ten został wykryty w USA nie tak dawno, gdyż w 1989 roku (Internet: Boron-Kaczmarek A., Janczewska-Kazek E., Pisula A.: Biologia wirusa zapalenia wątroby typu C i jej wpływ na patogenezę zakażenia. <http://journals.indexcopernicus.com/fulltxt.php?ICID=485997>). Nieleczona choroba bardzo często prowadzi do marskości wątroby i rozwoju pierwotnego raka tego narządu. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (World Health Organization, WHO), wirusem tym zakażonych jest około 3% ludzi na świecie. Rocznie u około 1-2% zakażonych pacjentów rozwija się pierwotny rak wątroby (rak wątrobowo-komórkowy) (8, 11, 15, 17, 29). HCV cechuje duża zmienność genetyczna, w związku z tym można wyróżnić co najmniej 6 jego genotypów (oznaczanych cyframi 1-6) oraz ponad 50 podtypów (oznaczanych kolejnymi literami alfabetu) (Internet: Seng-Lai T., 2006. Hepatitis C viruses: genomes and molecular biology [online], Horizon Scientific Press, Rozdz. 1, 5-47. http://books.google.pl/books?id=zf4C0V_7Lu4C). Tak duża zmienność i częste mutacje w genomie HCV, szczególnie regionu kodującego białka otoczki, są przyczyną skutecznego zabezpieczania się wirusa przed mechanizmami efektorowymi układu odpornościowego gospodarza (8, 17). Wykazano, że zakażenie HCV o genotypie 1b niesie największe ryzyko zachorowania ludzi na pierwotnego raka wątroby (11).

Do tej pory mechanizmy transformacji nowotworowej w zakażeniu HCV nie zostały dokładnie poznane, gdyż genom tego wirusa nie integruje się z DNA komórek gospodarza i nie posiada typowego onkogenu. Wiele wyników badań wskazuje na to, że stymulowana regeneracja tkanek i komórek wątrobowych odgrywa ważną rolę w karcinogenezie, a w procesie tym biorą udział trzy białka wirusowe, to jest C, NS3 i NS5A (Internet: Boroń-Kaczmarek A., Janczewska-Kazek E., Pisula A.: Biologia wirusa zapalenia wątroby typu C i jej wpływ na patogenezę zakażenia. <http://journals.indexcopernicus.com/fulltxt.php?ICID=485997>).

Białko kapsydu C – pośrednio i bezpośrednio – wpływa na niektóre czynniki transkrypcyjne, włączając w to: jądrowy czynnik transkrypcyjny NF- κ B, AP-1, E2F-1, helikazę RNA CAP-Rf, białko 14-3-3, „suwak” leucynowy i inne. Czynniki transkrypcyjne – „suwak” leucynowy jest zatrzymywany przez białko C w cytoplazmie, co prowadzi do jego inaktywacji i wzmocnienia transformacji komórkowej. W wyniku tej interakcji zwiększona zostaje liczba hepatocytów (15).

Stymulowana proliferacja jest opisywana jako bezpośredni skutek aktywowanej ekspresji MAPK (mitogen-activated protein kinase, kinaz białkowych aktywowanych mitogenami), grupy kinaz białkowych odgrywających rolę w regulacji odpowiedzi na miogeny kontaktujące się z komórkami. Wpływają one zatem na ekspresję genów oraz podziały, różnicowanie, ruch i apoptozę komórek. Do takich enzymów należy: ERK (extracellular signal-regulated kinases), JNK (c-Jun N-terminal kinases) i białko p38 (15). Natomiast białko C wpływa na gen p21, którego produkt białkowy jest modulatorem białka p53. Regulacja jego poziomu w komórce odbywa się na drodze zależnej i niezależnej od p53. Może to powodować apoptozę lub wzmoczoną proliferację komórek (w zależności od struktury molekularnej białka i drogi aktywacji p21). Funkcją białka C jest też oddziaływanie na ekspresję cykliny E na poziomie mRNA i białka. Stwierdzono ponadto stymulację proliferacji komórek wskutek zwiększania poziomu ekspresji TGF- α (poprzez aktywację wewnątrzjądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B) (15).

Białka rdzenia wirusa, z jednej strony, indukują, a z drugiej – wpływają supresyjnie na promotory HCV i komórek. Białko C aktywuje, między innymi, promotor genu c-myc i TGF- β . Hamuje natomiast ekspresję, na przykład, genu c-fos, p53 i IFN- β . Białko rdzenia oddziałuje na białko p53 za pomocą trzech mechanizmów: (i) przez fizyczną interakcję z białkiem, (ii) przez modulację na poziomie genu i (iii) modyfikacje potranslacyjne (11). Główna rola białka NS3 jest przypisana nasileniu martwicy wątroby, która sama w sobie jest czynnikiem ryzyka powstawania nowotworu. Białko NS3 wykazuje potrójną aktywność enzymatyczną: RNA-helikazy, proteiny seryny i nu-

kleozydotrójfosfatazy (NTP-aza). W patogenezie pierwotnego raka wątroby uwzględnia się region NS3 spełniający rolę helikazy. Jest on włączony w proces mutagenyzy i zaburzeń stabilności genetycznej (15).

Białko NS3, tak jak białko C, aktywuje ekspresję JNK i białka p38. Wzmacnia również aktywność czynników transkrypcyjnych, takich jak: AP-1, NF- κ B, aktywny czynnik transkrypcyjny-2. Przejawia się to jako ogólny efekt wzmacniania aktywności wiążącej DNA. NS3 stymuluje także telomerazę, a hamując aktywność genu p21 może podwoić tempo wzrostu komórek.

Onkogenne właściwości białka NS5A są podobne do opisanych u białka C i NS3. Białko NS5A występuje w formie podstawowej o masie 56 kDa i w formie hyperfosforylacyjnej o masie 58 kDa. Funkcje i właściwości białka zależą od stanu jego fosforylacji. Białko NS5A oddziałuje na białka p21 i p53 oraz cykliny. Obserwowana jest represja transkrypcji genu p21 (a co za tym idzie – inhibicji ekspresji genu p53) oraz aktywacja białka związanego z proliferacją komórkową (PCNA, Proliferating Cell Nuclear Antigen). Wynikiem tego jest zwiększenie liczby komórek o fenotypie typowym dla komórek nowotworowych. Białko NS5A może modulować białko NS3 oraz wzmacniać aktywność białka C za pośrednictwem czynnika NF- κ B (Internet: Boroń-Kaczmarek A., Janczewska-Kazek E., Pisula A.: Biologia wirusa zapalenia wątroby typu C i jej wpływ na patogenezę zakażenia. <http://journals.indexcopernicus.com/fulltxt.php?ICID=485997>). Inne badania wykazały, że indukcja drogi zależnej od NF- κ B może prowadzić do antyapoptotycznej aktywności białka NS5A. Do takiej aktywności należy interakcja z białkiem Bax, której wynikiem jest zahamowanie apoptozy (15).

NS5A indukuje powstawanie reaktywnych form tlenu (reactive oxygen species, ROS), które w wyniku mało jeszcze poznanych mechanizmów aktywują czynniki transkrypcyjne STAT-3 i NF- κ B. ROS może niszczyć DNA, prowadząc do mutacji, które są czynnikami inicjującymi nowotworzenie. NS5A wywołuje stres siateczki śródplazmatycznej (siateczki wewnątrzcytoplazmatycznej; ER, *reticulum endoplasmaticum*) powodując zakłócenie równowagi wapniowej, co prowadzi do podwyższenia poziomu ROS w mitochondriach. Wynikiem tych procesów jest transport czynników transkrypcyjnych do jądra komórkowego i ich aktywacja (29). Należy podkreślić, że ER dzieli się na ER szorstkie (granularne, ER-g; zawiera rybosomy) i ER gładkie (agranularne, ER-a; nie zawiera rybosomów), a rola tej struktury w zapewnieniu prawidłowości procesów zachodzących w komórce jest bardzo ważna ze względu na udział ER w syntezie białek (ER-g) oraz tłuszczów i sterydów (ER-a), jak również w syntezie węglowodanów, unieczynnianiu toksyn i leków, transporcie wewnątrzkomórkowym oraz w zapewnieniu komórce właściwej struktury.

Wirusy wywołujące nowotwory u zwierząt

Wirus mięsaka Rousa (Rous Sarcoma Virus, RSV). RSV należy do rodziny *Retroviridae* (wirusy RNA) rodzaju *Alpharetrovirus* grupującym retrowirusy ptaków, a szczepy tego wirusa (np. RSV Prague C; RSV Schmidt-Ruppin B; RSV Schmidt-Ruppin D) różnią się zakresem wrażliwych na zakażenie gospodarzy (oprócz drobiu również małpy, myszy, szczury, świnki morskie i chomiki) oraz właściwościami onkogennymi. W genomie RSV wyróżnia się klasyczne geny występujące u retrowirusów, to jest: gag, pro, pol i env oraz gen będący onkogenem wirusowym v-src. Sekwencja onkogenowa v-src nie jest niezbędna do replikacji wirusa, uczestniczy natomiast w transformacji nowotworowej komórek (19). Wirusem wspomagającym defektywne RSV jest wirus leukemii ptaków RAV (Rous-associated virus), który posiada informację kontrolującą ekspresję antygenów powierzchniowych wirusa i zakres gospodarzy wrażliwych na zakażenie RSV.

Mięsak indukowany przez RSV jest jednym z klasycznych, modelowych nowotworów, które powstają w wyniku działania pojedynczego onkogenu, jakim jest w tym przypadku v-src. Gen ten koduje kinazę tyrozynową, odpowiedzialną za wiele procesów przebiegających na poziomie molekularnym, które prowadzą do szybkich i dramatycznych zmian fenotypowych w komórkach zakażonego gospodarza. Specyficznym zmianom morfologicznym towarzyszącym transformacji oraz nadmiernej proliferacji komórek gospodarza towarzyszą zmiany w ekspresji genów. W przeszłości zidentyfikowano pojedyncze geny komórek gospodarza, które ulegały nadmiernej aktywacji lub represji w wyniku ekspresji v-src (1, 19).

Przeprowadzone ostatnio badania nie tylko potwierdziły, ale i wskazały nowe geny, które są rozregulowane przez onkogen v-src. Nadmiernej ekspresji w komórkach nowotworowych ulegają, między innymi, geny (1, 10):

- AP-1 (białko aktywatorowe, activating protein 1) działające jako czynnik transkrypcyjny;
- kodujące kolagenazę i stromielizynę;
- PLAU (aktywator plazminogenu typu urokinazy, urokinase-type plasminogen activator), odpowiedzialne za powstawanie plazminy podczas migracji komórek i przerzuty nowotworów, aktywację niektórych czynników wzrostu oraz regulację procesu apoptozy;
- GRP78 (znany również jako BiP, binding immunoglobulin protein) regulujące proliferację komórek i zabezpieczające je przed apoptozą;
- VIP (wazoaktywny peptyd jelitowy) o aktywności antyapoptotycznej;
- follistatyny będącej antagonistą aktywiny – produkty tych genów są czynnikami wzrostu o działaniu plejotropowym;
- fosfatazy o podwójnej swoistości (dual specificity phosphatases, DUSPs) zdolne do łączenia się z wielo-

ma substratami i powodujące ich defosforyzację – są one znane z inaktywacji kinazy MAP.

Konsekwencją nadmiernej ekspresji ww. genów jest prowokowanie nadmiernej proliferacji i rozrostu komórek nowotworowych z jednoczesnym hamowaniem apoptozy. Nadekspresja genu follistatyny prowadząca do obniżenia aktywności receptora TGF- β powoduje w konsekwencji wyłączenie sygnałów hamujących wzrost komórek.

Gen v-src wpływa również na supresję niektórych genów (1) w tym, między innymi, genów:

- CCN3 (znanego również jako NOV, nephroblastoma overexpressed) kodujących białka związane z komórkową matrix – hamujący wpływ v-src na ten gen, powoduje promowanie niezależnego wzrostu i migracji komórek zakażonych RSV;
- TGFBI (transforming growth factor, beta-induced, 68 kDa) – supresja tego genu powoduje, że komórka nowotworowa uzyskuje zdolność do utraty adhezji między komórkami tego samego typu, co jest pierwszym stadium tworzenia przerzutów;
- FHL1 (four and half LIM domain protein 1) – jego supresja sprowadza się do promowania niezależnego wzrostu komórek zakażonych RSV.

Podsumowując, u drobiu wykazano 20 genów na których regulację (ekspresję lub represję) wpływa onkogen wirusowy v-src. Jest to bardzo istotne, gdyż większość z tych genów ma swoje odpowiedniki w ludzkim genomie, a więc umożliwia to poznanie mechanizmów powstawania nowotworów u ludzi (1).

Wirus ptasiej mieloblastozy (Avian Myeloblastosis Virus, AMV). Innym retrowirusem powodującym zmiany nowotworowe u ptaków jest AMV, który należy do rodzaju *Alpharetrovirus*. Wirus ten wywołuje ostrą białaczkę szpikową u nowo wyklutych kurczaków. Badania *in vitro* wykazały, że produkcja wirionów z potencjałem leukemogennym wymaga obecności wirusów pomocniczych: MAV-1 oraz MAV-2 (myeloblastosis associated virus), które umożliwiają replikację AMV (23).

Właściwości transformujące AMV, tak jak w przypadku RSV, są głównie wynikiem aktywności onkogenu wirusowego v-myb, który jest zlokalizowany na końcu 3' genomu wirusa. Gen v-myb jest również elementem genomu innego onkogenego wirusa powodującego białaczkę u ptaków, to jest wirusa E26. U tych dwóch wirusów cały gen env został zastąpiony sekwencją onkogenową v-myb, a ponadto u wirusa E26 występuje druga sekwencja v-ets, która wzmacnia właściwości onkogenne tego wirusa (18).

Onkogen v-myb AMV, tak jak inne onkogeny, rozregulowuje podstawowe procesy (wzrost, różnicowanie i apoptozę) w komórce zakażonego gospodarza. Indukuje powstanie białaczki szpikowej po bardzo krótkim okresie latencji wirusa. Cechą wyróżniającą onkogen v-myb jest jego komórkowa specyficzność, gdyż transformacja komórkowa ma początek w liniach komórek makrofagów (1). Do tej pory nie poznano

dokładnych mechanizmów molekularnych onkogenezy, ale wiele danych doświadczalnych wskazuje na związek onkogenu wirusowego z genem *mim-1*, co prowadzi do rozregulowania tego ostatniego (7).

Gen *mim-1* wykazuje ekspresję głównie w granulocytach obojętnochłonnych (PMNs, polymorphonuclear cells). Jego dokładna funkcja nie jest poznana. Wykazano, że produktem tego genu jest acetylotransferaza oraz że może on być zaangażowany w proces zapalenia z udziałem PMNs. Promotor genu *mim-1* zawiera kilka miejsc wiążących *myb* i jest bezpośrednio regulowany przez *v-myb* (7).

Przez cały czas są prowadzone badania nad onkogenem *v-myb*, gdyż jego homolog znajduje się u wielu gatunków ssaków, w tym u człowieka. Może to pomóc w wyjaśnieniu powstawania białaczki szpikowej u ludzi, która jest powodowana zaburzeniem ekspresji protoonkogenu komórkowego *c-myb*. Ekspresja *c-myb* jest istotnym czynnikiem warunkującym proliferację limfocytów T u ludzi, a w przebiegu przewlekłej białaczki szpikowej wykryto mutację protoonkogenu polegającą na utracie domeny wiążącej inhibitory ekspresji. Sprowadza się to do gromadzenia mutacji i nadmiernej proliferacji komórek nowotworowych.

Wirus choroby Mareka (Marek's Disease Virus, MDV). *Alphaherpesvirus* MDV jest szeroko rozpowszechnionym i wysoce zaraźliwym wirusem drobiu, który wywołuje chorobę Mareka, nowotworową chorobę limfoproliferacyjną drobiu, głównie kur domowych wszystkich ras, linii i krzyżówek w chowie przemysłowym. Chorobę tę stosunkowo rzadko spotyka się u indyków, bażantów, przepiórek i kuropatw. MDV jest wirusem onkogenym wywołującym u zakażonych ptaków chłoniaka limfocytów T. Powoduje naciek nowotworowy nerwów obwodowych i narządów wewnętrznych. Wirus ten można podzielić na trzy serotypy. Tak więc, pomimo że wirusy te mają wspólne antygeny, można je odróżnić serologicznie.

Molekularne mechanizmy leżące u podstaw transformacji limfocytów T powodowanej przez MDV nie są dokładnie poznane. Wiadomo, że wirus z komórką gospodarza łączy się przede wszystkim w obrębie telomerów. MDV, wiążąc się z DNA gospodarza, może aktywować sąsiadujące geny na poziomie transkrypcyjnym, zmieniając prawidłową ekspresję genów komórki, co sprzyja transformacji nowotworowej (24). Właściwości onkogenne wykazują, między innymi: geny *meq*, *pp38*, *ICP4* oraz gen glikoproteiny C (*gp C*) (4, 16, 31).

Gen *meq* koduje białko o wielkości 399aa wykazujące homologię z rodziną białek onkogennych *Fos/Jun* (4). Gen ten ulega stałej ekspresji w limfoblastoidalnych komórkach nowotworowych i występuje tylko w genomie szczepów należących do serotypu 1 (28). Wykryto, że białko *c-fos* i *p53* może ulegać interakcji z białkiem *meq*, co sugeruje hamowanie apoptozy, a więc ma znaczący udział białka *meq* w onkogenezie. Wykazano również, że gen *meq* może brać udział

w procesie dimeryzacji nie tylko z innymi cząsteczkami *meq*, ale również z *c-jun*. Ponadto, dimer *meq/c-jun* może wzmacniać ekspresję genu *meq* (4), a produkt genu *meq* wykazuje wiele podobnych właściwości do innych onkogennych białek wirusów, takich jak, na przykład, kluczowych w onkogenezie białek E6 i E7 HPV (16).

Gen *pp38* koduje kompleks trzech białek o wielkości 290aa i masach 38, 36, 24 kDa (26, 28), które zostało wykryte w komórkach guza. Gen *pp38* wykazuje homologię w serotypie 1, 2 i 3, co sugeruje, że nie odgrywa on bezpośredniej roli w transformacji nowotworowej. Produkt tego genu jest jednak uznany za białko onkogenne, mające pośredni, choć jeszcze nie poznany, wpływ na onkogenezę (4).

Innym białkiem znalezionym w limfoblastycznych liniach komórkowych i komórkach guza jest białko *ICP4* (infected cell protein 4). Jedną z ważniejszych funkcji tego białka w zakażeniu MDV jest stymulacja zwiększonej ekspresji genu *pp38* (27). Natomiast *gpC* jest uznawana za jeden z głównych antygenów wirusowych powstających podczas zakażenia MDV. Wykazano, że obecność *gpC* jest związana ze zjadliwością i aktywnością onkogeną tego wirusa (4, 16, 31).

Tak więc udowodnione zostało działanie co najmniej czterech genów biorących udział w nowotworzeniu. Nie jest jednak wiadomo, czy geny te zapoczątkowują tylko transformację komórek gospodarza, czy biorą również udział w podtrzymaniu stanu nowotworowego.

Podsumowanie

Wirusy indukujące onkogenezę u ludzi i zwierząt należą do różnych grup taksonomicznych i są to zarówno wirusy zawierające DNA (z rodzin: *Adenoviridae*, *Hepadnaviridae*, *Herpesviridae*, *Papovaviridae*/*Polyomaviruses*, *Papillomaviruses*/, *Poxviridae*), jak i wirusy z RNA (*Retroviridae*). Różnią się one wielkością, architekturą oraz budową genomu i cyklami replikacyjnymi odmiennymi od wirusów nie wykazujących właściwości onkogennych, nawet z tych samych rodzin. Pozostają zwykle w stanie utajenia lub, tak jak w przypadku wirusów zapalenia wątroby (HCV), przyczyniają się do powstania zakażenia chronicznego. Indukcja nowotworzenia jest zazwyczaj powiązana z brakiem skutecznej kontroli nad wirusem onkogenym mechanizmów efektorowych układu immunologicznego zakażonego gospodarza. Opisane w tej pracy wirusy onkogenne wykształciły szereg mechanizmów, w tym zmieniające na poziomie molekularnym szlaki biochemiczne w komórkach permissywnych, co prowadzi do transformacji i immortalizacji komórek. Zwykle produkty genów wirusowych oddziałują z genami supresorowymi gospodarza, co ma miejsce w przypadku HPV-16 i HPV-18. Innym mechanizmem, spotykanym u HTLV-I, jest transaktywacja onkogenów komórek gospodarza. Mniej bezpośrednią strategią jest aktywność wirusa prowadząca do translokacji chromosomu, która skutkuje rozregulowaniem

onkogenów komórkowych. Jest to jedna z głównych przyczyn chłoniaka Burkitta, związanego z zakażeniem EBV. Spotykana jest również okresowa replikacja wirusa w komórkach gospodarza powodująca śmierć komórek z następującą po niej regeneracją, co jest z kolei charakterystyczne dla HCV. Warto podkreślić, że niektóre wirusy mogą działać jako czynniki karcinogenne w żywych organizmach, a inne mogą indukować onkogenezę tylko w modelowym układzie doświadczalnym.

Piśmiennictwo

1. Andersson K. B., Kowenz-Leutz E., Brendeford E. M., Tygset A. H., Leutz A., Gabrielsen O. S.: Phosphorylation-dependent down-regulation of c-Myb DNA binding is abrogated by a point mutation in the v-myb oncogene. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 3816-3824.
2. Barmak K., Haraj E., Grant Ch., Alefantis T., Wigdahl B.: Human T cell leukemia virus type 1-induced disease: pathways to cancer and neurodegeneration. *Virology* 2003, 308, 1-12.
3. Bienias J., Krzemiński S., Mazurek U.: Charakterystyka wirusa Epsteina-Barr – aspekty epidemiologiczne, bimolekularne i transplantologiczne. *Post. Mikrobiol.* 2007, 46, 153-165.
4. Biggs P. M.: Marek's disease herpesvirus: oncogenesis and prevention. *The Leeuwenhoek Lecture* 1997, 352, 1951-1962.
5. Blacklow N. R.: Viruses, [w:] Gorbach S. L., Bartlett J. G., Blacklow N. R. (wyd.): *Infectious Diseases*. 3rd Ed. Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia 2006, 1891-2165.
6. Bonnez W.: Human papillomavirus vaccine – recent results and future developments. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2007, 7, 470-477.
7. Burk O., Mink S., Ringwald M., Klempnauer K. H.: Synergistic activation of the chicken mim-1 gene by v-myb and C/EBP transcription factors. *J. EMBO* 1993, 12, 2027-2038.
8. Czepiel J., Biesiada G., Mach T.: Wirusowe zapalenie wątroby typu C. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2008, 118, 734-740.
9. Damania B.: DNA tumor viruses and human cancer. *Trends Microbiol.* 2007, 15, 38-44.
10. Dehbi M., Mbiguino A., Beauchemin M., Gilles C. G., Bedar P. A.: Transcriptional activation of the CEF-4/9E3 cytokine gene by pp60^{v-src}. *Mol. Cell. Biol.* 1992, 12, 1490-1499.
11. Di Bisceglie A. M.: Hepatitis C and Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 1997, 26 (Suppl. 1), 35-37.
12. Dobrzańska J., Sawczuk-Chabin J., Warzocha K.: Rola wirusów w etiopatogenezie chłoniaków nieziarniczych. *Onkol. Prakt. Klin.* 2006, 2, 64-72.
13. Ferreira Jr. O. C., Planelles V., Rosenblatt D.: Human T-cell leukemia viruses: epidemiology, biology, and pathogenesis. *Blood Rev.* 1997, 11, 91-104.
14. Howie H. L., Katzenellenbogen R. A., Galloway D. A.: Papillomavirus E6 proteins. *Virology* 2009, 384, 324-334.
15. Kasprzak A., Adamek A.: Role of hepatitis C virus proteins (C, NS3, NS5A) in hepatic oncogenesis. *Hepato. Res.* 2008, 38, 1-26.
16. Król K., Samorek-Salamonowicz E., Kozdruiń W.: Molekularna charakterystyka genów i białek wirusa Mareka. *Post. Mikrobiol.* 2005, 44, 351-356.
17. Liao J. B.: Viruses and Human Cancer. *Yale J. Biol. Med.* 2006, 79, 115-122.
18. Lipsick J. S., Wang D.-M.: Transformation by v-Myb. *Oncogene* 1999, 18, 3047-3055.
19. Masker K., Golden A., Gaffney C. J., Mazack V., Schwindinger W. F., Zhang W., Lu-Hai Wang L.-H., Carey D. J., Sudol M.: Transcriptional profile of Rous Sarcoma virus transformed chicken embryo fibroblasts reveals new signaling targets of viral src. *Virology* 2007, 364, 10-20.
20. McLaughlin-Drubin M. E., Münger K.: The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology* 2009, 384, 335-344.
21. Mikołajczyk K., Żaba R.: Zakażenia HPV jako problem kliniczny. *Przew. Lek.* 2005, 5, 38-47.
22. Mueller N.: Overview: Viral Agents and Cancer. *Environ. Health Perspect.* 1995, 103 (Suppl. 8), 259-261.
23. Perbal B.: Avian myeloblastosis virus (AMV): only one side of the coin. *Retrovirology* 2008, 5, 49-53.
24. Samorek-Salamonowicz E.: Choroba Mareka – wybrane zagadnienia. *Medycyna Wet.* 2009, 65, 812-816.
25. Smith M. R., Greene W. C.: Molecular Biology of the Type I Human T-Cell Leukemia Virus (HTLV-I) and Adult T-Cell Leukemia. *J. Clin. Invest.* 1991, 87, 761-766.
26. Szkaradkiewicz A.: Drobnoustroje i onkogeneza. *Współ. Onkol.* 2003, 7, 96-101.
27. Takatsuki K.: Adult T-cell Leukemia. *Intern. Med.* 1995, 34, 947-952.
28. Vogt P. K.: Cancer genes. *Wes. J. Med.* 1993, 158, 273-278.
29. Waris G., Siddiqui A.: Regulatory mechanisms of viral hepatitis B and C. *J. Biosci.* 2003, 28, 311-321.
30. Wensing B., Farrell P. J.: Regulation of cell growth and death by Epstein-Barr virus. *Microb. Infect.* 2000, 2, 77-84.
31. Xie Q., Anderson A. S., Morgan R. W.: Marek's disease virus (MDV) ICP4, pp38, and meq genes are involved in the maintenance of transformation of MDCCMSB1 MDV-transformed lymphoblastoid cells. *J. Virol.* 1996, 70, 1125-1131.
32. Young L. S., Murray P. G.: Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* 2003, 22, 5108-5121.
33. Zimmer C.: Evolved for cancer. *Sci. Am. Special.* 2008, 18, 15-21.
34. zur Hausen H.: Oncogenic DNA viruses. *Oncogene* 2001, 20, 7820-7823.
35. zur Hausen H.: Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion From Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 2000, 92, 690-698.
36. zur Hausen H.: Viruses in Human Cancers. *Eur. J. Cancer.* 1999, 35, 1878-1885.

Adres autora: lic. Aleksandra Wojtala, Zakład Immunologii, Katedra Nauk Przedklinikcznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: olaw87@poczta.onet.pl (A.W. wykonuje pracę magisterską pod kierunkiem M.N.; e-mail: marek_niemialowski@sggw.pl)