



Udział wirusów w transformacji nowotworowej komórki

Marcin Schmidt, Agnieszka Olejnik, Anna Goździcka-Józefiak
Zakład Wirusologii Molekularnej, Instytut Biologii Molekularnej
i Biotechnologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

Neoplastic cell transformation by viruses

Summary

Tumor-inducing viruses occur in several taxonomic groups. All RNA tumor viruses belong to retrovirus family, but the DNA tumor viruses come from several different groups. Their oncogenic potential is associated with their replication strategy, and in a vast majority of cases oncogenic transformation occurs only if the viral life cycle is aborted. The oncogenic phenotype results from discrete changes in the expression of key cellular control genes: oncogenes and tumor suppressor genes. Most often, the retroviruses cause the activation of oncogenes, and DNA tumor viruses usually target tumor suppressor genes.

Key words:

tumor viruses, cell transformation, oncogenes, tumor suppressor genes.

Adres do korespondencji

Marcin Schmidt,
Zakład Wirusologii
Molekularnej,
Instytut Biologii
Molekularnej
i Biotechnologii,
Uniwersytet
im. Adama Mickiewicza,
ul. Międzychodzka 5,
60-371 Poznań,
e-mail:
mschmidt@amu.edu.pl

1. Wstęp

Wirusy są to czynniki infekcyjne niezdolne do wytwarzania cząstek potomnych poza komórką. Infekcje wirusowe mogą przebiegać bezobjawowo lub manifestować się różnorodnymi objawami chorobowymi. Wirusy zdolne do indukcji nowotworów nazwane są wirusami onkogennymi. Należą one do różnych grup taksonomicznych, a ich materiałem genetycznym jest DNA lub RNA (patrz tab. 1).

Tabela 1

Wirusy onkogenne (wg 2)

Przynależność taksonomiczna	Przykłady ^a	Wywoływane nowotwory
wirusy typu RNA		
retrowirusy		
ssacze typu B	MMTV	rak sutka, chłonniki wywodzący się z limfocytów T
ssacze typu C	GLV, Mo-MLV, FLV, Mo-MSV, Ki-MSV, Ha-MSV, FeLV, GA-FeSV, SM-FeSV, SSV	białaczki, chłonniki, mięsaki
ptasie typu C	RSV, RAV, ALV, AMV, AEV, MH2-AMV, MC29	mięsaki, chłonniki wywodzące się z limfocytów B, białaczki szpikowe i erytroidalne
HTLV-BLV	HTLV BLV	białaczka wywodząca się z limfocytów T chłonniki wywodzący się z limfocytów B
wirusy typu DNA		
adenowirusy	wszystkie typy	różne guzy lite
wirusy wątrobowe	HBV	rak wątrobowokomórkowy
herpeswirusy	EBV, KSHV, HVS	chłonniki Burkitta, raki nosa i gardła, mięsaki Kaposiego
papowawirusy		
poliomawirusy	SV40, polioma, BKV, JCV	różne guzy lite
wirusy brodawczaka	HPV typy „wysokiego ryzyka”	brodawkowate przerosty, raki
poksywirusy	SFV	śluzaki, włókniaki

^a MMTV (*mouse mammary tumor virus*), wirus powodujący raka sutka u myszy; GLV (*Gross leukemia virus*), wirus Grossa powodujący białaczkę; Mo-MLV (*Moloney murine leukemia virus*), wirus Moloneya powodujący białaczkę u myszy; FLV (*Friend leukemia virus*), wirus Frienda powodujący białaczkę; Mo-MSV (*Moloney murine sarcoma virus*), wirus Moloneya powodujący mięsaki u myszy; Ki-MSV (*Kirsten murine sarcoma virus*), wirus Kirstena powodujący mięsaki u myszy; Ha-MSV (*Harvey murine sarcoma virus*), wirus Harveya powodujący mięsaki u myszy; FeLV (*feline leukemia virus*), wirus powodujący białaczkę u kotów; GA-FeSV (*Gardner-Amstein feline sarcoma virus*), wirus Gardner-Amstein powodujący białaczkę u kotów; SM-FeSV (*Susan McDonough feline sarcoma virus*), wirus Susan McDonough powodujący białaczkę u kotów; SSV (*simian sarcoma virus*), wirus powodujący mięsaki u małp; RSV (*Rous sarcoma virus*), wirus powodujący mięsaki Rousa; RAV (*Rous sarcoma-associated virus*) wirus towarzyszący wirusowi powodującemu mięsaki Rousa; ALV (*avian leukosis virus*), wirus powodujący białaczkę u ptaków; AMV (*avian myeloblastosis virus*), wirus powodujący mielo-blastozę u ptaków; AEV (*avian erythroblastosis virus*), wirus powodujący erytroblastozę u ptaków; MH2-AMV (*Mill-Hill 2-avian myelocytoma virus*), wirus Mill-Hill typ 2 powodujący mielo-cytozę u ptaków; MC29 (*myelocytomatosis virus 29*); HTLV (*human T-lymphotropic virus*), ludzki wirus białaczki wywodzącej się z limfocytów T; BLV (*bovine leukemia virus*), wirus powodujący białaczkę u bydła; HBV (*Hepatitis B virus*), wirus wątrobowy typu B; EBV (*Epstein-Barr virus*), wirus Epstein-Barra; KSHV (*Kaposi-sarcoma-associated herpesvirus*), wirus herpes powodujący mięsaki Kaposiego; HVS (*herpes-saimiri virus*); SV40 (*simian vacuolating virus 40*); BKV (*BK-virus*), Polyomavirus hominis 1; JCV (*JC-virus*), Polyomavirus hominis 2; HPV (*human papillomavirus*), ludzki wirus brodawczaka; SFV (*Sbope fibroma virus*).

Mechanizm indukowania nowotworów przez wirusy jest bardzo zróżnicowany. Największy potencjał onkogeny wykazują niektóre retrowirusy powodujące powstawanie nowotworu w ciągu kilku dni od infekcji, u niemal wszystkich zaka-

zonych osobników. Większość wirusów wymaga jednak długiego okresu latencji (infekcji utajonej – bezobjawowej) przy niskim odsetku zapadalności na choroby nowotworowe. Wystąpienie nowotworowego fenotypu jest rezultatem subtelnych zmian ekspresji genów odpowiedzialnych przede wszystkim za kontrolę wzrostu i różnicowania komórek. Stwierdzono, że do transformacji nowotworowej komórki wystarcza pojedyncza cząstka wirusa. W komórkach transformowanych wykazano obecność całości lub tylko części wirusowego genomu. Dlatego nie zawsze dochodzi w nich do produkcji pełnych cząstek potomnych wirusa, natomiast niemal we wszystkich przypadkach obserwuje się ekspresję fragmentów jego materiału genetycznego. Transformacja nowotworowa komórki często jest dla wirusa niekorzystna. W komórkach takich nierzadko obserwuje się spadek wydajności produkcji wirionów potomnych w porównaniu do replikacji litycznej, a niekiedy wytworzenie nowotworu prowadzące do śmierci gospodarza uniemożliwia replikację wirusa (1).

2. Transdukujejące retrowirusy

Typowy genom retrowirusów jest zbudowany z dwóch identycznych nici RNA zawierających trzy typy genów: *gag*, *pol* i *env* oskrzydłone niekodującymi sekwencjami regulatorowymi zwanymi LTR (*long terminal repeats*). Złożone retrowirusy zawierają dodatkowe geny kodujące białka biorące udział w ich replikacji. Niektóre z nich mają poza tym gen *v-onc*, którego produkt białkowy (patrz tab. 2) może działać na niemal każdym etapie przekazywania sygnałów w komórce (3,4). Aktywność tych białek nie jest jednak konieczna dla replikacji wirusowego materiału genetycznego. Prawdopodobnie są to geny pobrane z genomu komórki podczas replikacji wirusowego materiału genetycznego. Stąd mają one swoje komórkowe homologi *c-onc*. Transdukowane (wprowadzone do genomu retrowirusa) onkogeny komórkowe są z reguły skrócone z jednego lub obu końców (*truncated*) i mogą zawierać mutacje punktowe bądź delecje. Często są one połączone ramką odczytu z sekwencjami kodującymi białka wirusowe (niezadko także skróconymi). Fuzja z białkiem wirusowym wzmacnia aktywność komórkowego białka onkogenego (5,6).

Tabela 2

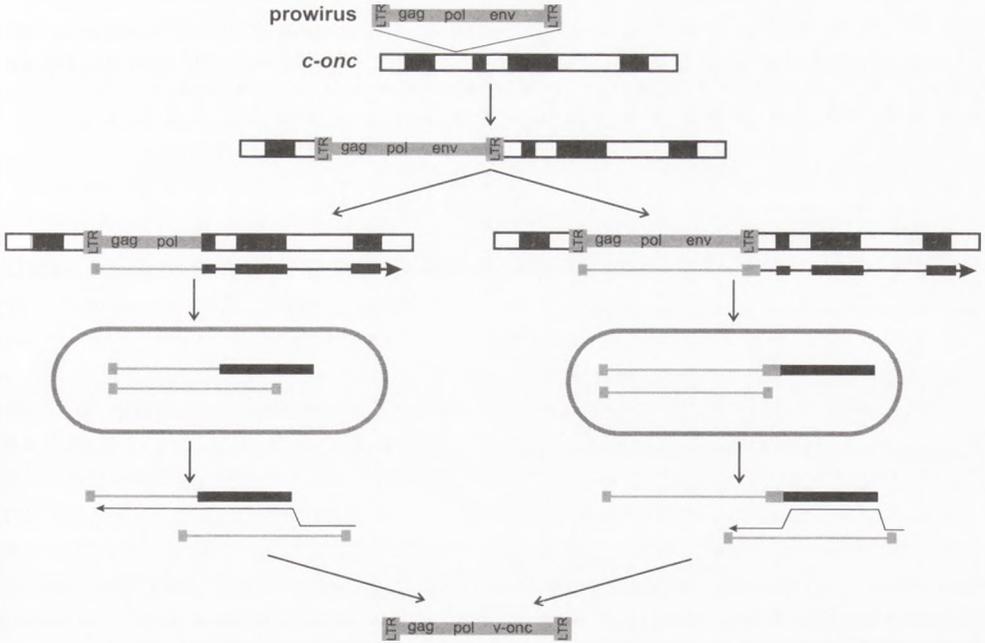
Nektóre transdukowane onkogeny retrowirusów uszeregowane wg aktywności w komórce (wg 2,4)

Funkcja	<i>v-onc</i>	Retrowirus	Komórkowy homolog
1	2	3	4
czynnik wzrostu	<i>sis</i>	SSV	PDGF
receptory dla czynników wzrostu o aktywności kinazy tyrozynowej	<i>erbB</i>	AEV-H, AEV-ES4	receptor dla EGF
	<i>fms</i>	SM-FeSV	receptor dla CSF-1
	<i>sea</i>	AEV-S13	?
	<i>kit</i>	HZ4-FeSV	receptor dla hematopoetyny
	<i>ros</i>	UR2-ASV	?

1	2	3	4
receptor dla hormonów	<i>erbA</i>	AEV-ES4	receptor dla hormonów tyroidowych
GTPaza	<i>Ki-ras</i> <i>Ha-ras</i>	Ki-MSV Ha-MSV	białko G
aktywator kinaz tyrozynowych	<i>crk</i>	CT10, ASV-1	białko adaptorowe SH-2/3
przekazywanie sygnału	<i>src</i> <i>abl</i> <i>fps</i> <i>fes</i>	RSV A-MLV FuSV ST-FeSV	niereceptorowe kinazy tyrozynowe
przekazywanie sygnału	<i>mos</i> <i>raf</i> <i>mil</i>	Mo-MSV MSV-3611 MH2-AMV	niereceptorowe kinazy serynowo-treoninowe
regulacja ekspresji	<i>v-jun</i> <i>v-fos</i> <i>v-myc</i> <i>v-myb</i> <i>v-ets</i> <i>v-rel</i>	ASV-17 FBJ-MSV MC29, MH2-AMV AMV-E26 AMV-E26 REV-T	czynniki transkrypcyjne

AEV-H, -ES4, -S13 (*avian erythroblastosis virus-H, -ES4, -S13*), wirusy powodujące erytroblastozę u ptaków; HZ4-FeSV (*Hardy-Zuckerman-4 feline sarcoma virus*), wirus Hardyego-Zuckermana typ 4 powodujący mięsaki u kotów; UR2-ASV (*UR2-avian sarcoma virus*), wirus UR2 powodujący mięsaki u ptaków; ASV-1 (*avian sarcoma virus-1*); A-MLV (*Abelson murine leukemia virus*), wirus Abelsona powodujący białaczkę u myszy; FuSV (*Fujinami avian sarcoma virus*), wirus Fujinami powodujący mięsaki u ptaków; ST-FeSV (*Snyder-Theilen feline sarcoma virus*), wirus Snyder-Theilen powodujący mięsaki u kotów; Mo-MSV (*Moloney murine sarcoma virus*), wirus Moloneya powodujący mięsaki u myszy; MSV-3611 (*murine sarcoma virus-3611*); FBJ-MSV (*Finkel-Biskis-Jenkins murine sarcoma virus*); REV-T (*avian reticuloendotheliosis virus-T*), wirus powodujący siatkowicę u ptaków; PDGF (*platelet derived growth factor*), płytkopochodny czynnik wzrostu; EGF (*epidermal growth factor*), nabłonkowy czynnik wzrostu; CSF-1 (*colony stimulating factor-1*) czynnik stymulujący kolonie.

Transdukcja onkogenu komórkowego do genomu retrowirusa jest zjawiskiem rzadkim. Zakłada się, że w pierwszej jej fazie dochodzi do integracji retrowirusa do genomu komórki powyżej onkogeny. Powstały prowirus ma przypuszczalnie delecję obejmującą 3'LTR i jest w tej samej orientacji transkrypcyjnej co komórkowy onkogen. Stąd transkrypcja inicjowana na 5'LTR obejmuje również sekwencje kodującą onkogen, a po wycięciu intronów takie RNA może zostać upakowane do wirionu. Model ten zakłada równocześnie infekcję komórki drugą cząstką wirusa, której genom nie uległ delecji i w trakcie replikacji dostarczył genomowych RNA wirusa i białek potrzebnych do składania wirionów potomnych. W ten sposób powstawać mogą heterozygotyczne wiriony potomne (genom retrowirusów jest diploidalny) zawierające cząsteczkę kompletnego genomowego i defektywnego chimerycznego RNA. Po infekcji heterozygotycznym wirusem, podczas odwrotnej transkrypcji, dojść może do niehomologicznej rekombinacji pomiędzy dwiema cząsteczkami RNA. Proponowany model (patrz rys. 1) zakłada dwukrotną rekombinację materiału genetycznego. Pierwsza zachodzi na poziomie DNA podczas integracji defektywnego



Rys. 1. Hipotetyczne mechanizmy transdukcji onkogenu komórkowego do genomu retrowirusa. Po integracji prowirusa w obrębie onkogenu komórkowego dochodzi do delecji fragmentu prowirusa wraz z 3'LTR i sekwencji onkogenu (lewa strona schematu) lub mutacji sygnału terminacji transkrypcji w obrębie 3'LTR pozwalającej na powstawanie chimerycznego transkryptu (prawa strona schematu). Obecność w komórce drugiej kopii prowirusa umożliwia produkcję białek wirusowych i składanie wirionów o heterozygotycznym genomie. Dzięki zdolności odwrotnej transkryptazy do przeskoku pomiędzy matrycami dochodzi do rekombinacji pomiędzy cząsteczkami RNA i odbudowania 3'LTR.

prowirusa w obrębie sekwencji kodującej onkogen, a druga odbywa się na poziomie RNA podczas odwrotnej transkrypcji umożliwiając odbudowanie 3'LTR. W ten sposób powstały chimeryczny retrowirus ma oba LTR (5,7-10).

Transdukowane retrowirusy są z reguły defektywne ze względu na zastąpienie części sekwencji wirusowych sekwencjami kodującymi komórkowy onkogen. Takie retrowirusy przechodzą niepełny cykl replikacyjny i nie powstają ich cząstki potomne. Wirusy te zdolne są jednak do transformacji nowotworowej komórki. Do wytworzenia i uwolnienia infekcyjnych cząstek transdukowanego retrowirusa może dojść jedynie w przypadku koinfekcji komórki kompletnym retrowirusem (zapewniającym syntezę brakujących białek wirusowych).

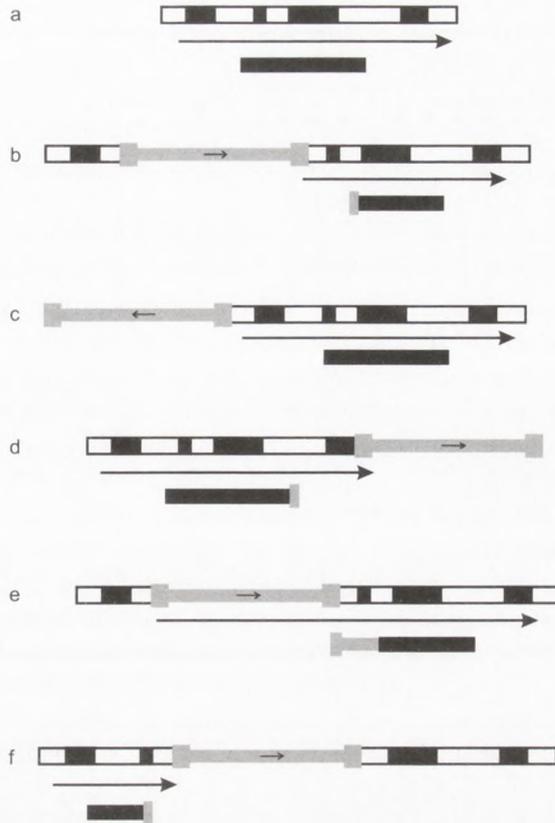
Komórkowe onkogeny zostały zidentyfikowane tylko u części retrowirusów (dawniej zaliczanych do podrodziny „onkowirusy”), nie stwierdzono ich, jak dotąd, w genomach wirusów należących do rodzaju lenti- i spumawirusy, pomimo że wszystkie przechodzą taki sam cykl replikacyjny, mogący sprzyjać pobraniu onko-

genu komórkowego. Prawdopodobnie przyczyną tego jest większa złożoność genomów i mechanizmów kontrolujących replikację u przedstawicieli tych dwóch rodzajów.

3. Retrowirusy o aktywności onkogennej typu *cis*

Niektóre z retrovirusów są zdolne do transformacji nowotworowej komórki, pomimo że nie ma w ich genomie sekwencji kodujących białka onkogenne. Wywoływane przez nie nowotwory są jednak podobne do indukowanych przez transdukowane retrowirusy (mięsaki, białaczki), chociaż proces ten zachodzi po dłuższym okresie latencji (kilka tygodni lub miesięcy). Wirusy te nie są zdolne do transformacji linii komórkowych *in vitro*, natomiast we wszystkich transformowanych komórkach pochodzących od jednego osobnika miejsce integracji prowirusa jest takie samo. Świadczy to o monoklonalności nowotworu. Pomimo że pierwotnej infekcji komórki dokonał wirus o kompletnym genomie i zaszło kilka cykli jego replikacji, prowirus w komórce nowotworowej ma z reguły postać defektywną, lecz zawsze zawiera co najmniej jedno LTR, a miejsca jego integracji są zlokalizowane w bliskim sąsiedztwie komórkowych onkogenów. Obecność sekwencji prowirusa prowadzi do wzrostu transkrypcji komórkowego onkogeny. Sytuacja taka jest określana mianem *cis*-aktywacji lub insercyjnej aktywacji (rzadko dochodzi do insercyjnej inaktywacji, gdzie integracja wirusa zaburza transkrypcję genu supresji transformacji nowotworowej). Bardzo często przyczyną tego procesu jest insercja promotora lub wzmacniacza transkrypcji (*transcription enhancer*). W przypadku insercji promotora powstający chimeryczny mRNA zawiera elementy regulatorowe regionów R i U5 wirusowego LTR wraz z sekwencją kodującą komórkowy onkogen. Insercja wzmacniacza transkrypcji nie wymaga integracji prowirusa powyżej protoonkogeny i w takiej samej co on orientacji transkrypcyjnej, może on być także zlokalizowany poniżej tej sekwencji. W tym przypadku transkrypty onkogeny nie zawierają sekwencji wirusowych. Mechanizmy te wraz z innymi są przedstawione na rysunku 2. Wśród retrovirusów aktywujących proces nowotworzenia w układzie *cis* zidentyfikowano szczepy o zróżnicowanym potencjale onkogenym, który determinowany jest strukturą LTR i może zmieniać się w wyniku mutacji lub rekombinacji zachodzących w tym rejonie (11-14).

Najlepiej poznanym przykładem retrovirusa o onkogennej aktywności typu *cis* jest wirus ptasiej białaczki (ALV – *avian leukosis virus*). W komórkach nowotworowych transformowanych tym wirusem miejsce integracji najczęściej jest zlokalizowane pomiędzy eksonem 1 (niekodującym) a eksonem 2 genu *c-MYC* lub w obrębie eksonu 1. Prowirus ma charakter defektywny (delecja regionu 5'), a transformacja zachodzi w wyniku insercji promotora. Powstające fuzyjne transkrypty wirusowo-komórkowe są inicjowane na 3'LTR prowirusa. Znane są też przypadki insercji wzmacniacza transkrypcji przez ALV w obrębie genu *c-MYC* (15). Innymi przykładami



Rys. 2. Efekty integracji retrowirusów: a – nienaruszony gen (czarne prostokąty oznaczają eksony, białe introny lub sekwencje niekodujące) ulega przepisaniu do pierwotnego transkrypty (strzałka z pełnym grottem), który następnie ulega składaniu do mRNA (czarny pełny prostokąt). Insercja retrowirusa (szary prostokąt, strzałka oznacza orientację prowirusa) może doprowadzić do zmiany profilu ekspresji i wielkości transkrypty; b – insercja promotora – sekwencje regulatorowe z 3'LTR prowirusa przejmują kontrolę nad ekspresją genu zmieniając jej profil, a czasami też powodują skrócenie transkrypty; c – insercja enhancera, integracja prowirusa w odwrotnej orientacji powyżej naturalnego promotora prowadzić może do deregulacji ekspresji; d – insercja terminatora, sygnał poliadenylacji z 5'LTR prowirusa powoduje powstawanie skróconego białka, a powstające mRNA może być pozbawione sygnałów warunkujących szybką degradację transkrypty; e – insercja lidera, transkrypcja zainicjowana z 5'LTR prowirusa prowadzi do powstawania chimerycznych białek; f – insercyjna inaktywacja, sygnał poliadenylacji z 5'LTR prowirusa prowadzi do przedwczesnej terminacji transkrypcji, a powstające skrócone białko jest pozbawione domen warunkujących jego aktywność.

retrowirusów o aktywności onkogennej typu *cis* są typy 1 i 2 wirusa towarzyszącego wirusowi RSV (*Rous-associated virus*) oraz wirus wywołujący raka sutka u myszy (MMTV – *mouse mammary tumor virus*) (14,16,17).

4. Retrowirusy o aktywności onkogennej typu *trans*

W mechanizmie transformacji komórek retrowirusami o aktywności onkogennej typu *trans* zakłada się zmianę regulacji transkrypcji jednego lub więcej genów istotnych dla regulacji cyklu komórkowego przez wirusowe białko regulatorowe. Retrowirusem prowadzącym do powstania w ten sposób nowotworów jest typ 1 ludzkiego wirusa białaczki limfocytów T (HTLV-1 – *human T-cell leukemia virus-1*). Wirus ten nie posiada sekwencji kodujących onkogen, a zintegrowany prowirus jest kompletny i zdolny do replikacji. Do jego integracji dochodzi w losowo wybranym miejscu genomu. Wszystkie transformowane komórki mają jednak prowirusa zintegrowanego do tego samego miejsca komórkowego genomu. Wywodzą się zatem z linii monoklonalnej. Transformacja nowotworowa komórek zdarza się rzadko – u około 1% zainfekowanych osobników i po długim okresie latencji (nawet 20 lat). Brak ekspresji genów prowirusa HTLV-1 w transformowanych komórkach świadczy, że produkty wirusowych genów być może są niezbędne do inicjacji transformacji, lecz nie do utrzymania transformowanego fenotypu. Prowirus ulega aktywacji jedynie w transformowanych komórkach hodowanych *in vitro*. Prawdopodobnie za inicjację transformacji odpowiada produkt genu *tax* będący aktywatorem transkrypcji. Białko regulatorowe *tax* rozpoznaje specyficzne sekwencje w obrębie LTR i reguluje wraz z komórkowymi czynnikami transkrypcyjnymi ekspresję prowirusowych genów. Wykazano, że białko to wpływa także na zmianę ekspresji niektórych genów komórkowych, np. kodujących czynniki transkrypcyjne CREB/ATF i NF- κ B oraz czynnika wzrostu limfocytów typu T – interleukiny 2 (IL-2). Nadekspresja komórkowych czynników transkrypcyjnych powoduje zmianę ekspresji licznych białek komórkowych. Tak na przykład niekontrolowana ekspresja IL-2 odpowiedzialna jest za stymulację autokrynową prowadzącą do wzmożonej proliferacji limfocytów, sprzyjającej spontanicznej transformacji nowotworowej komórek (18-23).

5. Inne mechanizmy transformacji nowotworowej komórki z udziałem retrowirusów

Analiza zdarzeń odpowiedzialnych za transformację nowotworową wywołaną przez niektóre retrowirusy wskazuje na zróżnicowany mechanizm ich działania. Przykładem może być wirus Frienda powodujący białaczkę (*Friend leukemia virus*). Infekcja tym wirusem prowadzi do transformacji nowotworowej poprzez współdziałanie kilku czynników, w tym: białka otoczki wirusa, insercyjnej aktywacji genów *FLI-1* lub/i *SPI-1* oraz często inaktywacji komórkowego genu supresji transformacji nowotworowej *p53*. Do transformacji komórki układu krwiotwórczego potrzebne jest natomiast współdziałanie dwóch wirusów: zdolnego do replikacji retrowirusa i defektywnego wirusa zwanego SFFV (*spleen focus-forming virus*; pierwszy z nich pełni funkcję wirusa pomocniczego). W pierwszym etapie transformacji główną rolę odgrywa

wirus SFFV, zawierający gen kodujący zmienione białko płaszczka gp55. Białko to ma powinowactwo do receptora dla erytropoetyny, może zatem aktywować go działając jak mitogen na erytroblasty prowadząc do ich intensywnej, lecz niezłśliwej proliferacji. Przy udziale retrowirusa pomocniczego możliwa jest replikacja obu wirusów i produkcja infekcyjnych cząsteczek potomnych. Drugi etap transformacji zachodzi w pojedynczej komórce. Wśród licznych dzielących się erytroblastów może znaleźć się taka komórka, w której genomie dojdzie do integracji prowirusa w obrębie sekwencji kodujących czynniki transkrypcyjne FLI-1 lub/i SPI-1 i aktywacji ich ekspresji, oraz inaktywacji genu supresji transformacji nowotworowej *p53*. W ten sposób powstaje monoklonalna nowotworowa linia komórkowa. Opisany mechanizm drugiej fazy transformacji jest rzadki, ale w licznej populacji intensywnie proliferujących erytroblastów prawdopodobieństwo jej zajścia jest zwiększone. Proces ten łączy w sobie mechanizmy onkogenne typu *cis* i *trans* – insercyjna aktywacja i inaktywacja oraz stymulacja autokrynowa (14,23-25).

6. Onkogenne wirusy typu DNA

Wirusy onkogenne o genomie zbudowanym z dwuniciowego kwasu deoksyrybonukleinowego wywołują nowotwory u ludzi i zwierząt lub są tylko zdolne do transformacji nowotworowej komórek w systemach *in vitro* oraz u specjalnych odmian zwierząt laboratoryjnych. Genom onkogennych wirusów typu DNA koduje białka wczesne mogące blokować aktywność protein komórkowych odpowiadających za supresję transformacji nowotworowej (retinoblastoma i *p53*). Wynikiem tego jest przejście komórki ze stanu spoczynku do fazy S cyklu komórkowego. Onkogeny wirusów typu DNA są integralną i niezbędną częścią ich genomów i z reguły nie mają pochodzenia komórkowego. Infekcja onkogennymi wirusami typu DNA komórki permissywnej prowadzi do wytworzenia dużej ilości wirionów potomnych i śmierci komórki gospodarza przez co inicjacja procesów transformacji nie jest zauważalna. Transformację nowotworową można zaobserwować jedynie w przypadkach gdy są infekowane komórki niepermissywne lub cykl replikacyjny wirusa został przerwany. Zjawisku temu często towarzyszy integracja wirusowego genomu do genomu komórki gospodarza. Spośród onkogennych wirusów typu DNA (patrz tab. 1) najlepiej poznane są: adenowirusy, poliomawirusy i wirusy brodawczaka.

Za właściwości onkogenne adenowirusów odpowiadają białka kodowane przez dwie ramki odczytu: ORF E1A i E1B. Produkty ich transkrypcji ulegają alternatywnemu składaniu prowadząc do powstawania dwóch białek z każdej ramki odczytu. Na bazie ORF E1A syntetyzowane są białka E1A₁₂₅ i E1A₁₃₅ (zawierające odpowiednio: 243 i 289 aminokwasów), a z ORF E1B: białka E1B_{55kD} i E1B_{19kD} (zbudowane odpowiednio z: 495 i 175 aminokwasów). Formy E1A wykazują dużą homologię sekwencji aminokwasowej. Białko o mniejszej masie cząsteczkowej jest pozbawione 46-aminokwasowego fragmentu w domenie wewnętrznej. Homologii takiej nie wykazują

białka E1B ze względu na przesunięcie ramki odczytu. Za właściwości transformujące odpowiadają białka E1A_{13S} (oddziałujące na białko pRb) i E1B_{55kD} (oddziałujące na białko p53). Białko E1B_{55kD} adenowirusów typu 12 bardzo słabo lub wcale nie oddziałuje na p53. Aktywuje natomiast komórkowy onkogen *MDM2*, którego produkt białkowy wiążąc się z p53 hamuje jego aktywność (26,27).

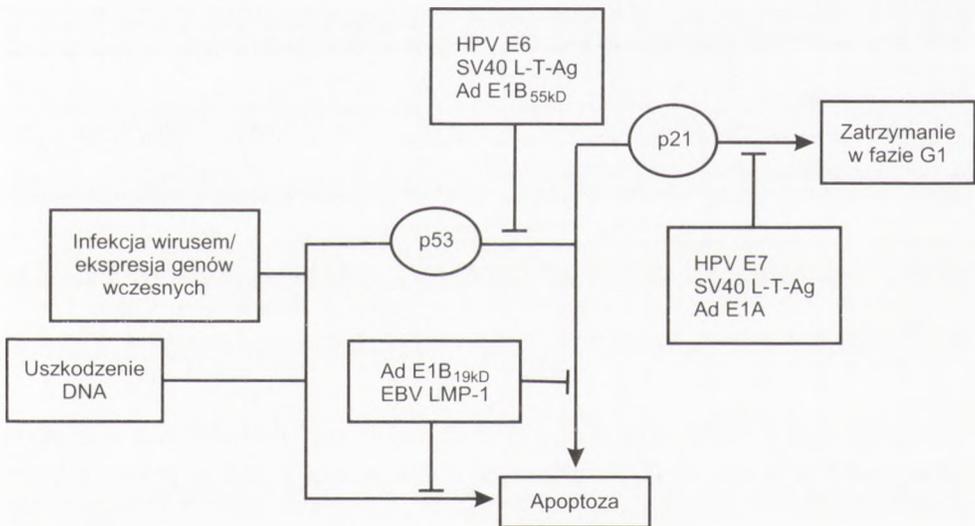
Duży potencjał onkogenny posiadają również poliomawirusy. Najlepiej poznanymi z tej grupy są mysz poliomawirus (*mouse polyomavirus*), małpi wirus SV40 (*simian vacuolating virus 40*) oraz ludzkie wirusy BKV i JCV (*BK-*, *JC-virus*; oznaczenia BK i JC pochodzą od inicjałów pacjentów u których pierwotnie oznaczono te wirusy). BKV i JCV kodują wielofunkcyjne białko zwane dużym antygenem T, które wiąże się z wirusowym DNA w rejonie *ori*. Proteina ta wykazuje aktywność ATPazy oraz helikazy i jest zaangażowana w regulację inicjacji replikacji wirusowego DNA. Za właściwości transformujące wirusa odpowiedzialne są oddziaływania antygeny T z białkiem pRb, a w przypadku SV40 także z p53. Wydajność transformacji jest podwyższona w obecności aktywującego białka zwanego małym antygenem T. Wykazuje on homologię z N-końcem dużego antygeny T, oraz posiada dodatkową sekwencję uzyskaną na drodze alternatywnego składania transkryptu. Mały antygen T oddziałuje na komórkową fosfatazę białek PP2A hamując jej aktywność, natomiast poprzez interakcję z czynnikiem transkrypcyjnym E2F aktywuje transkrypcję prowadzoną przez polimerazy RNA klasy II i III. W odróżnieniu od SV40, mysz poliomawirus koduje także średni antygen T (o wspólnym N-końcu z małym i dużym antygenem T oraz dodatkową sekwencją powstałą na drodze alternatywnego składania i przesunięcia ramki odczytu). Antygen ten jest osadzony w błonie komórkowej i wykazuje zdolność do wiązania i aktywacji kinaz tyrozynowych z rodziny *Src* oraz kinazy fosfatydyloinozitolu-3 (PI-3) (28-30).

Liczną grupą wirusów, z których część ma duży potencjał onkogenny są wirusy brodawczaka. Genom ich koduje m.in. trzy białka o właściwościach onkogennych: E5, E6 i E7. W przypadku bydłych wirusów brodawczaka (BPV – *bovine papillomavirus*) główną rolę w transformacji komórki odgrywa białko E5, przy współudziale białek E6 i E7. Natomiast transformujący potencjał ludzkich wirusów brodawczaka (HPV – *human papillomavirus*) zależy głównie od białek E6 i E7, przy niewielkim udziale białka E5. Zjawiskiem inicjującym transformację wirusami HPV jest często integracja ich genomu z genomem gospodarza, poprzedzona przerwaniem wirusowej ORF E2. Brak regulatorowego białka represorowego E2 powoduje podwyższenie ekspresji białek E6 i E7 prowadzących do transformacji komórki gospodarza. Białko E5 jest związane z błonami komórkowymi i poprzez oddziaływanie na receptory dla płytkopochodnego PDGF (*platelet derived growth factor*) i naskórkowego EGF (*epidermal growth factor*) czynnika wzrostu aktywuje niektóre komórkowe białka biorące udział w przekazywaniu sygnału do jądra. Białko E6 wiążąc się z białkiem p53 kieruje je do degradacji, natomiast E7 wykazuje zdolność wiązania się z białkiem retinoblastoma (pRb). Interakcje E7 z pRb/E2F prowadzą do uwolnienia czynnika transkrypcyjnego E2F odpowiedzialnego za aktywację licznych genów komórko-

wych (31-33). Onkoproteina E7 oddziałuje także na białka: p107, p130 cykliny A i p21 (34).

7. Wpływ białek wirusowych na aktywność białek odpowiedzialnych za supresję transformacji nowotworowej

Pomimo odrębności filogenetycznej onkogennych wirusów typu DNA wykorzystywane przez nie mechanizmy transformujące wykazują zadziwiającą ewolucyjną konwergencję. Białka tych wirusów poprzez oddziaływanie na proteiny kontrolujące cykl komórkowy: pRb i p53 powodują ich inaktywację czego efektem jest transformacja nowotworowa komórek (1). Białko pRb reguluje przejście komórki z fazy stacjonarnej do fazy S cyklu komórkowego (35,36). Natomiast p53 jest odpowiedzialne za supresję transformacji nowotworowej. W przypadku uszkodzenia genomu komórki białko to zatrzymuje cykl komórkowy w fazie G₁ umożliwiając naprawę materiału genetycznego. Kiedy jednak uszkodzenia są zbyt duże skierowuje komórkę na drogę programowanej śmierci poprzez apoptozę (patrz rys. 3) (27). Niektóre wirusy indukują także apoptozę aby ułatwić składanie i pakowanie wirionów potomnych oraz ich uwolnienie (37). Zapobieganie przedwczesnej apoptozie, poprzez inhibicję białka supresji transformacji nowotworowej p53, jest jednak konieczne dla optymalnej replikacji wirusa (38).



Rys. 3. Schemat sygnalizacji komórkowej prowadzący do zatrzymania cyklu komórkowego lub indukcji apoptozy z udziałem białek komórkowych p53 i p21 (owale) w odpowiedzi na infekcję wirusową i uszkodzenia DNA, oraz wskazane są etapy, na których oddziałują poszczególne białka onkogenne wirusów (27).

Większość wirusowych onkoprotein (patrz tab. 3), podobnie jak onkoproteina E7 wirusów HPV, wiążąc się z komórkowym białkiem pRb prowadzi do rozbitcia kompleksu E2F/pRb. Uwolniony w ten sposób czynnik transkrypcyjny E2F aktywuje liczne geny komórkowe odpowiedzialne za przygotowanie komórki do wejścia w fazę S cyklu komórkowego. Przymuszczalnie poza E2F, białko pRb oddziałuje także na czynniki transkrypcyjne takie jak: c-MYC, ELF-1, MYO-D i cyklinę D. Na komórkowe białko p53 oddziałują m.in. onkoproteiny: E1B_{55kD} adenowirusów, E6 wirusów brodawczaka i antygen T SV40. Białka te rozpoznają odrębne domeny p53 (patrz rys. 4), przez co też różnie wpływają na jego aktywność. Antygen T stabilizuje nieaktywną konformację białka p53, onkoproteina E6 poprzez ubikwitynację kieruje je do degradacji, a E1B_{55kD} blokuje sekwencje odpowiedzialne za transkrypcyjną aktywację (39) i nie dopuszcza do przeniesienia p53 z cytoplazmy do jądra (40). Jedynym wyjątkiem jest mysz poliomawirus, który nie koduje białka oddziałującego na komórkowe białko p53.

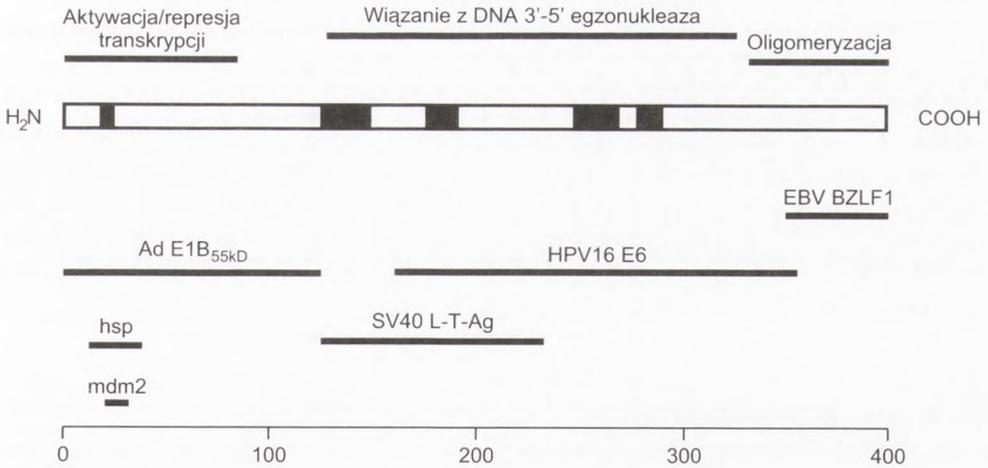
Tabela 3

Białka wirusów onkogennych typu DNA warunkujące i/lub wspomagające transformację nowotworową poprzez zaburzanie aktywności białek komórkowych (zmienione, wg 1)

Wirus	Szlak pRb	Szlak p53	Sygnalizacja interferonu	Inne aktywności
adenowirusy	E1A	E1B i E4	E1A	?
BPV/HPV	E7	E6	E6	E5, E6
SV40	L-T-Ag	L-T-Ag	L-T-Ag	?
polioma	L-T-Ag	L-T-Ag	?	M-T-Ag
HBV	?	HBx	?	?
EBV (HHV4)	EBNA2, EBNA-LP	LMP1, BHRF1, (EBNA-LP)	EBNA2, BCRF1	LMP1, EBNA1
HVS	ORF 72 (vCyc)	ORF 71 (vFLIP), ORF 16 (vBCL2)	?	ECRF3
KSHV (HHV8)	ORF 72 (vCyc)	ORF K13 (vFLIP), ORF K2 (vIL6), ORF K9 (vIRF), ORF 16 (vBCL2)	ORF K9 (vIRF)	ORF K1, ORF74 (vGcr)

BPV/HPV – bydłęcy/ludzki wirus brodawczaka; HBV – wirus wątrobowy typu B; EBV (HHV4) wirus Epstein-Barr (ludzki herpes wirus typ 4); KSHV (HHV8) herpes wirus wywołujący mięsaka Kaposiego (ludzki herpes wirus typ 8).

Białka wirusowe zdolne są także do zatrzymania sygnału indukowanego przez interferon (41). Ważną rolę w jego regulacji odgrywają również białka supresji transformacji nowotworowej prowadzące np. do przerywania syntezy kwasów nukleinowych w niezainfekowanych komórkach lub wywołujące apoptozę, zapobiegając rozprzestrzenianiu się wirusa. Natomiast indukcja przez interferon ekspresji głównego antygeny zgodności tkankowej (MHC – *major histocompatibility complex*) zwiększa zdolność układu immunologicznego do wykrycia zainfekowanych komórek.



Rys. 4. Schemat struktury białka supresji transformacji nowotworowej p53. Prostokąt oznacza sekwencję aminokwasową białka (około 400 aminokwasów). Ciemne pola oznaczają rejony silnie zakonserwowane ewolucyjnie. Powyżej oznaczono funkcje poszczególnych regionów białka p53, a poniżej regiony, z którymi oddziałują poszczególne białka komórkowe (hsp, mdm2) lub wirusowe (E1B, L-T-Ag, E6 i BZLF1) (27).

Powiązanie sygnałów powstających podczas aktywacji komórki interferonem z aktywnością białek supresji transformacji nowotworowej sugeruje, że inhibicja sygnalizacji pochodzącej od interferonu sprzyja replikacji wirusa, a co za tym idzie transformacji nowotworowej (1,42,43). Poza tym wykazano, że białko BCRF1 wirusa EBV, jest homologiem interleukiny 10 (IL-10), która hamuje syntezę interferonu przez limfocyty T i IL-12 przez makrofagi. Wirusowy homolog IL-10 stymuluje również proliferację limfocytów B, zwiększając populację komórek permissywnych dla tego wirusa oraz hamuje dojrzewanie i funkcjonowanie komórek dendrytycznych, co zwiększa przeżywalność wirusa EBV (44). Mechanizm polegający na blokadzie przekazywania sygnału do komórki poprzez interferon opisano również dla adenowirusów (białko E1A), SV40 (duży antygen T) i KSHV (białko ORF K9 – vIRF) (1). We wstępnych badaniach wykazano, że onkogenne białko E6 wirusa HPV16 może na poziomie transkrypcji hamować odpowiedź komórkową na interferon (45,46).

Inne mechanizmy wspomagające transformację to stymulacja aktywności kinazy tyrozynowej i kinazy fosfatydylo-3-inzoytolu przez białko *Src* aktywowane przez średni antygen T mysiego poliomawirusa, jak również kinazy tyrozynowej receptora PDGF przez białko E5 BPV (32). Transformację nowotworową wspomagać może także białko E6 HPV zwiększając aktywność telomerazy (47). W przypadku wirusa EBV kodowane przez niego białko LMP1 poza udziałem w blokadzie apoptozy powoduje również aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, co prowadzi do proliferacji zainfekowanej komórki. Z kolei białko EBNA1 blokuje prezentację antygenów umożli-

wiając zainfekowanym komórkom wymknienie się spod kontroli układu immunologicznego (44).

Wspomniano już, że geny kodujące białka wirusów typu DNA wykazują niewielką lub brak homologii do genów komórkowych. Wyjątkiem jest herpes wirus wywołujący mięsaka Kaposiego (KSHV), inaczej zwany ludzkim wirusem herpes typ 8. Genom KSHV zawiera liczne geny kodujące białka o wyraźnej homologii do komórkowych białek regulatorowych (1,48). Przypuszcza się, że ważną rolę w transformacji komórki przez KSHV odgrywa stymulacja autokrynowa zainfekowanej komórki (48).

8. Wirusy w biotechnologii

Badania nad strukturą i replikacją wirusów, a także ich oddziaływań na komórkę znacznie przyczyniły się do poznania mechanizmów kierujących metabolizmem komórkowym (49). Wraz z pogłębianiem wiedzy o biologii wirusów zaczęto się zastanawiać nad możliwościami praktycznego ich wykorzystania. Spośród wirusów onkogennych największą uwagę skupiły retrowirusy (50), adenowirusy (51-54), a także EBV i BPV (55,56), które znajdują zastosowanie jako wektory w biotechnologii i terapii genowej. Wirusowe wektory mają zmienioną postać, wobec ich naturalnych odpowiedników. Większość z nich została pozbawiona zdolności do replikacji poprzez delekcje sekwencji *ori* lub części genomu kodującej niektóre białka regulatorowe i strukturalne, a dostarczane *in trans* przez specjalnie zmodyfikowane linie pakujące (50). Ważnym aspektem dla wektorów przeznaczonych do terapii genowej jest pozbawienie ich zdolności do transformacji komórek poprzez delekcje sekwencji kodujących onkoproteiny (52,54), a także możliwość modyfikacji ich białek płaszcza lub osłonki dla uzyskania odpowiedniej specyfiki tkankowej infekcji (57). Geny wirusowe próbuje się także stosować do uśmiercania komórek nowotworowych. Wykorzystuje się w tym celu np. gen kodujący kinazę tymidylanową wirusa opryszczki. Enzym ten znacznie różni się od swojego komórkowego homologu i może fosforylować szerszą grupę substratów. Jednym z nich jest gancyklowir. Związek ten nie jest szkodliwy dla komórek, natomiast jego fosforylowane pochodne są silnie toksyczne. Dlatego wprowadzenie genu kodującego kinazę tymidylanową do komórek nowotworowych zwiększa ich wrażliwość na gancyklowir.

Zastosowanie niektórych wirusów w biotechnologii i medycynie budzi jednak wiele wątpliwości z powodu niskiej wydajności tych systemów we wprowadzaniu genów, możliwość wywoływania odpowiedzi immunologicznej, jak również rekombinacji z wirusami pochodzącymi z naturalnych infekcji co mogłoby spowodować rozwój procesu chorobowego.

9. Podsumowanie

Do transformacji nowotworowej komórki dochodzi w wyniku nieprawidłowego działania czynników kontrolujących drogi przekazu sygnałów w komórce oraz odpowiedzialnych za regulację cyklu komórkowego. Cykl replikacyjny retrowirusów związany jest z integracją wirusowego genomu do genomu gospodarza. Zjawisku temu może towarzyszyć pobranie materiału genetycznego z komórki (transdukcja) oraz aktywacja (rzadziej inaktywacja) komórkowych genów. Inny możliwy mechanizm transformacji nowotworowej zakłada zmianę regulacji transkrypcji genów komórkowych poprzez nieonkogenne białka regulatorowe retrowirusów (patrz tab. 4). Natomiast onkogenne wirusy typu DNA zaburzają komórkowe mechanizmy regulujące wzrost, wprowadzając onkoproteiny oddziałujące na specyficzne regulatorowe białka komórkowe (patrz tab. 3). Porównanie mechanizmów transformujących onkogennych wirusów typu RNA i DNA wskazuje, że ich aktywność ukierunkowana jest na dwie różne klasy genów komórkowych i ich produktów: onkogenów i genów supresji transformacji nowotworowej. Onkogeny kodują białka odpowiedzialne za stymulację wzrostu, natomiast geny supresji transformacji nowotworowej – negatywne regulatory wzrostu komórki, głównie regulujące cykl komórkowy. Ich inaktywacja prowadzi do deregulacji tych mechanizmów.

Tabela 4

Mechanizmy odpowiedzialne za właściwości onkogenne retrowirusów (2)

Kategoria onkogenego retrowirusa	Okres latencji	Wydajność transformacji	Mechanizm transformacji	Struktura genomu wirusa	Zdolność do transformacji <i>in vitro</i>
transdukujący	krótki (dni)	wysoka (nawet 100%)	onkogen pochodzenia komórkowego zawarty w genie wirusa	chimera wirus-onkogen komórkowy; defektywny	tak
o aktywności typu <i>cis</i>	średni (tygodnie, miesiące)	wysoka lub średnia	onkogen komórkowy aktywowany <i>in situ</i> przez pro-wirusa	nienaruszony genom, zdolny do replikacji	nie
o aktywności typu <i>trans</i>	długi (miesiące, lata)	bardzo niska (ok. 5%)	zaburzenie kontroli transkrypcji genów komórkowych przez wirusowe białka regulatorowe	nienaruszony genom, zdolny do replikacji	nie

Niedawno wysunięta została nowa hipoteza dotycząca transformacji nowotworowej wywołanej infekcją wirusową, której mechanizm byłby wspólny dla wszyst-

kich wirusów onkogennych. Według niej podstawowym momentem inicjującym transformację jest integracja wirusowego DNA do genomu komórki gospodarza. Komórka broniąc się przed „obcym” materiałem genetycznym „wycisza” go poprzez metylacje. Taka modyfikacja DNA prowadzi do zmiany struktury chromatyny, oraz ekspresji wielu genów. Hipoteza ta nie została jeszcze dostatecznie potwierdzona, jednak wiele danych eksperymentalnych wskazuje na możliwość współdziałania tego procesu w zaburzaniu stabilności genomu komórki (58).

Infekcja wirusem onkogennym nie zawsze jest czynnikiem wystarczającym do wywołania transformacji nowotworowej. Zidentyfikowano grupy wirusów, których przedstawiciele charakteryzują się zróżnicowanym potencjałem onkogennym lub go nie posiadają wcale. Poznano już ponad 100 typów wirusa HPV, spośród których za najbardziej onkogenne uważa się typy 16 i 18. Natomiast HPV-5 i -8 wykazują wysoki potencjał onkogenny jedynie u osób z obniżoną odpornością immunologiczną, a większość typów wywołuje tylko niezłośliwe przerosty (59). Także w obrębie danego typu obserwuje się zmienność genetyczną (polimorfizm) mającą wpływ na aktywność wirusa (60,61). Podobnie spośród adenowirusów typy 2, 5, 12 uważa się za najbardziej onkogenne (58).

Wiele z tych patogenów pozostaje w fazie latentnej i dopiero po kilku latach indukuje powstanie nowotworu. Czynniki wspomagającymi ten proces są: obniżenie odporności immunologicznej wywołane infekcją wirusem HIV lub przyjmowaniem leków immunosupresyjnych – EBV (27), KSHV (48) i HPV (59), zakażenie malarrią – EBV (27,61) lub *Chlamydia trachomatis* – HPV (62), związki karcinogenne takie jak: N-nitrozoaminy – EBV lub aflatoksyny – HBV (27,61). Do czynników podwyższających zagrożenie zalicza się także genetyczne predyspozycje, a w szczególności posiadany haplotyp HLA (27,34,61).

Literatura

1. Moore P. S., Chang Y., (1998), Trends Genet., 14, 144-150.
2. Nevins J. R., Vogt P. K., (1996), *Fields Virology*, Eds. Fields B. N., Knipe D. M., Howley P. M. i in., 301-343, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia USA.
3. Hunter T., (1997), Cell, 88, 333-346.
4. Schmidt M., Goździcka-Józefiak A., (1999), *Na pograniczu chemii i biologii*, III, red. Koroniak H., Barciszewski J., 277-299, Wyd. Nauk. UAM, Poznań.
5. Coffin J. M., (1992), Microbiol. Immunol., 176, 143-164.
6. Cooper G. M., (1995), *Oncogenes*, Jones & Barlett Publishers, Boston.
7. Felder M.-P., Eychene A., Barnier J. V., Calogeraki I., Calothy G., Marx M., (1991), J. Virol., 65, 3633-3640.
8. Felder M.-P., Laugier D., Eychene A., Calothy G., Marx M., (1993), J. Virol., 67, 6853-6856.
9. Goldfarb M. P., Weinberg R. A., (1981), J. Virol., 38, 136-150.
10. Bister K., (1986), Adv. Viral Oncol., 6, 45-50.
11. Kung H. J., Vogt P., (1991), Curr. Top. Microbiol. Immunol., 171.
12. Wolff L., (1997), Biochim. Biophys. Acta, 1332, F67-F104.
13. Fan H., (1997), Trends Microbiol., 5, 74-82.

14. Jonkers J., Berns A., (1996), *Biochim. Biophys. Acta*, 1287, 29-57.
15. Gong M., Semus H. L., Bird K. J., Stamer B. J., Ruddell A., (1998), *J. Virol.*, 72, 5517-5525.
16. Fung Y.-K. T., Lewis W. G., Crittenden L. B., Kung H.-J., (1983), *Cell*, 33, 357-368.
17. Nusse R., (1988), *Trends Genet.*, 4, 291-295.
18. Gallo R. C., (1986), *Sci. Am.*, 255, 88-89.
19. Pozzatti R., Vogel J., Jay G., (1990), *Mol. Cell. Biol.*, 10, 413-417.
20. Kitajima I., Shinohara T., Bilakovics J., Brown D. A., Xu X., (1992), *Science*, 258, 1792-1795.
21. Smith M. R., Green W. C., (1991), *J. Clin. Invest.*, 88, 1038-1042.
22. Saggiaro D., Majone F., Forino M., Turchetto L., Chieco-Bianchi L., (1992), *Leukemia*, 6, 648-668.
23. Ben-David Y., Bernstein A., (1991), *Cell*, 66, 831-834.
24. D'Andrea A. D., (1992), *Cancer Surv.*, 15, 19-36.
25. Johnson P., Benchimol S., (1992), *Cancer Surv.*, 12, 137-151.
26. Zantema A., van der Eb A. J., (1995), *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 199, 1-23.
27. Neil J. C., Cameron E. R., Baxter E. W., (1997), *Trends Microbiol.*, 5, 115-120.
28. Scarpa A., Tognon M., (1998), *Int. J. Mol. Med.*, 1, 1011-1023.
29. Levine A. J., Momand J., Finlay C. A., (1991), *Nature*, 351, 453-456.
30. Levine A. J., (1992), *New Engl. J. Med.*, 326, 1350-1352.
31. Halpern A. L., McCance D. J., (1996), *Human Papillomaviruses 1996*, Eds. Myers G., Bernard H.-U., Delius H. i in., III, 81-111, Los Alamos National Laboratory Press, Los Alamos USA.
32. Myers G., Androphy E., (1995), *Human Papillomaviruses 1995*, Eds. Myers G., Bernard H.-U., Delius H. i in., III, 46-57, Los Alamos National Laboratory Press, Los Alamos USA.
33. Munger K., Halpern A. L., (1997), *Human Papillomaviruses 1997*, Eds. Myers G., Bernard H.-U., Delius H. i in., III, 17-36, Los Alamos National Laboratory Press, Los Alamos USA.
34. Campo M. S., (1998), *Trends Microbiol.*, 6, 424-426.
35. Jansen-Durr P., (1996), *Trends Genet.*, 12, 270-275.
36. Moran E., (1993), *Curr. Opin. Genet. Develop.*, 3, 63-70.
37. Teodoro J. G., Branton P. E., (1997), *J. Virol.*, 71, 1739-1746.
38. White E., (1995), *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 199, 34-58.
39. Yew P. R., Liu X., Berk A. J., (1994), *Genes Develop.*, 8, 190-202.
40. van den Heuvel S. J., van Laar T., The I., van der Eb A. J., (1993), *J. Virol.*, 67, 5226-5234.
41. Maudsley D. J., (1991), *Biochem. Soc. Trans.*, 19, 291-296.
42. Harada H., Kitagawa M., Tanaka N., Yamamoto H., Harada K., Ishihara M., Taniguchi T., (1993), *Science*, 259, 971-974.
43. Gao S. J., Boshoff C., Jayachandra S., Weiss R. A., Chang Y., Moore P. S., (1997), *Oncogene*, 15, 1979-1986.
44. Cohen J. I., (1999), *Curr. Opin. Immunol.*, 11, 365-370.
45. Nees M., Geoghegan J. M., Hyman T., Frank S., Miller L., Woodworth C. D., (2001), *J. Virol.*, 75, 4283-4296.
46. Koromilas A. E., Li S., Matlashewski G., (2001), *Cytokine Growth Factor Rev.*, 12, 157-170.
47. Veldman T., Horikawa I., Barrett J. C., Schlegel R., (2001), *J. Virol.*, 75, 4467-4472.
48. Schulz T. F., Moore P. S., (1999), *Trends Microbiol.*, 7, 196-200.
49. Bernardi F., Haenni A.-L., (1998), *Biochimie*, 80, 1035-1041.
50. Gordon E. M., Anderson W. F., (1994), *Curr. Opin. Biotech.*, 5, 611-616.
51. Bett A. J., Prevec L., Graham F. L., (1993), *J. Virol.*, 67, 5911-5921.
52. Kling J., (1996), *Nature Biotech.*, 14, 948.
53. Kovacs I., Brough D. E., Bruder J. T., Wickham T. J., (1997), *Curr. Opin. Biotech.*, 8, 583-589.
54. Benihoud K., Yeh P., Perricaudet M., (1999), *Curr. Opin. Biotech.*, 10, 440-447.
55. Calos M. P., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 4084-4085.
56. Scimenti C. R., Calos M. P., (1998), *Curr. Opin. Biotech.*, 9, 476-479.
57. Peng K.-W., Russell S. J., (1999), *Curr. Opin. Biotech.*, 10, 454-457.
58. Doerfler W., (1996), *Biochim. Biophys. Acta*, 1288, F79-F99.
59. zur Hausen H., (1996), *Biochim. Biophys. Acta*, 1288, F55-F78.

60. Xi L. F., Koutsky L. A., Galloway D. A., Kuypers J., Hughes J. P., Wheeler C. M., Holmes K. K., Kiviat N. B., (1997), *J. Natl. Cancer Inst.*, 89, 796-802.
61. Griffin B. E., (2000), *Mutation Res.*, 462, 395-405.
62. Lehmann M., Groh A., Rodel J., Nindl I., Straube E., (1999), *J. Inf.*, 38, 12-17.