

284546

T. C.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇEŞİTLİ LENFOMALI HASTALARDA EPSTEİN - BARR
VİRUSU ÇEKİRDEK ANTİJENLERİNİN (EBNA)
ANTİ - KOMPLEMAN İMMÜN FLORESANS TEKNİĞİ
(ACIF) İLE ARAŞTIRILMASI

TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

MELTEM ARIKAN

ANKARA — 1985

T.C.

HACETTEPE UNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTOSU

ÇEŞİTLİ LENFOMALI HASTALARDA EPSTEIN - BARR VİRUSU ÇEKİRDEK
ANTİJENLERİNİN (EBNA) ANTI - KOMPLEMAN İMMUNFLORESANS (ACIF)
TEKNİĞİ İLE ARAŞTIRILMASI

TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

MELTEM ARIKAN

REHBER ÖĞRETİM ÜYESİ : Prof. Dr. ALTAN GÜNALP

ANKARA - 1985

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1 - 2
GENEL BİLGİLER	3 - 26
- EBV 'nun Özellikleri	9 - 15
- EBV 'nun Epidemiyolojisi ve Enfeksiyonları	15 - 21
- EBV ile ilgili Antijenler	21 - 26
MATERYAL VE METOD	27 - 33
BULGULAR	34 - 48
TARTIŞMA	49 - 54
ÖZET	55
KAYNAKLAR	56 - 70

GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser hastalığı çok faktörlü bir hastalıktır. Etiyolojisinde genetik, immüno-
lojik, hormonal, metabolik, diyetsetel birçok iç kaynaklı faktör rol alabileceği
gibi radyasyon, kimyasal maddeler ve viruslar gibi dış kaynaklı faktörler de
rol alabilmektedir. Neoplastik hastalıkların orijini ve gelişiminde virusların
rolü olduğu konusu, bugün sürekli araştırılan alanlardan birisidir. Primat kan-
serlerinin de bulunduğu birçok memeli kanserleri ile bazı virus tiplerinin i-
lişkisinin bulunduğu bilinmektedir, fakat doğal koşullarda tümör patogenezi
ve etiolojisinde virusların rolünü direkt olarak göstermek oldukça zordur.
Tümör patogenezisinde ve etiolojisinde virusların rolü üzerinde çalışılan
bir biyolojik bilim dalı haline gelen viral onkoloji (oncovirology) gelişti-
rilen birçok immünojik ve biyokimyasal metod aracılığı ile virus - tümör
ilişkisi üzerine delil getiren konuları ortaya çıkarmaya çalışmaktadır.

Bu amaçla viral onkoloji çalışmaları için epidemiyolojik araştırmalar yapılmak-
tadır. Sadece klasik epidemiyolojik metodlarla özellikle insan tümörlerinin vi-
ral orijini konusunun aydınlatılması sınırlı kalmaktadır. Viral onkoloji çalış-
maları için elektron mikroskobu metodları da gerekli inceleme kolaylığını sağ-
layan tekniklerdir. Viruslarla indüklenen tümörlerin hepsinde viral partikülle-
rin görülmemesi yüzünden sadece elektron mikroskobu çalışmaları da yeterli gel-
memektedir. Ayrıca tümörlerde yalnızca viral partikülleri görmek de etiyojik
açıdan virusların etken olduğunu kanıtlamaya yetmemektedir.

Viruslarla indüklenen tümörlerde elektron mikroskobu ile görülmeyen viral anti-

jenler, tümör - virus ilişkisi konusunda üzerinde önemle durulan bir parametredir. Bu antijenler ya virus partiküllerinin komponentleridir ya da virusa ait genetik materyalin kodladığı ama yapısal olmayan viral proteinlerdir. Bu antijenlerin tümör gelişimini ne şekilde etkiledikleri, üzerinde en çok çalışılan konulardan birisidir. Tümör dokularında mevcut olan bu tür viral antijenlerin varlığının saptanması konusunda en yaygın teknikler ise immünfloresans yöntemleridir.

EBV (Epstein - Barr Virusu), varlığının kanıtlandığı günden beri BL (Burkitt lenfoması) başta olmak üzere NPC (nazofarengeal karsinoma) ve diğer bazı lenfoproliferatif hastalıkların etiyolojik ajanı olabileceği konusunda dikkatleri çekmiştir. Bu hastalıklarda yapılan seroepidemiyolojik çalışmalarla virus ile olan ilgi gösterilebildiği gibi, tümör hücrelerinde de viral antijenlerin ve özellikle viral genomun varlığını kanıtlayıcı EBNA (Epstein - Barr çekirdek antijenleri) 'nin gösterilmesi EBV 'nun bu tümör tipleri ile olan ilgisi konusunda dikkat çeken durumlardır.

Bizim çalışmamızda da ; EBNA 'nin varlığını göstermek için yaygın olarak kullanılan ACIF (anti - kompleman immünfloresans) tekniğini kullanarak, lenf nodu biyopsisi yapılan çeşitli lenfomalı ve diğer lenfoproliferatif hastalığı olan hastaların biyopsi hücrelerinde, EBNA 'nin varlığını incelemek, tanı kriteri olarak bu tekniği hastanemizde sürekli uygulama alanına getirmek ve ülkemizde, ileride bu hastalıklarla ilgili olarak yapılacak etiyolojik araştırmalar için başlangıç teşkil etmek, amaç edinilmiştir.

GENEL BİLGİLER

Kanserin viral etiyojisi konusundaki ilk bulgular 1908 yılında Ellerman ve Bang tarafından tavuk lösemi virusu, 1911 yılında da Rous tarafından tavuk sarkoma virusunun gösterilmesidir. Bu çalışmaları 1932 yılında Shope 'nin yabani tavşanların deri fibroma ve papillomalarında, 1934 yılında Lucké 'nin kurbağa böbrek adenokarsinomalarında virusların indükleyici rol oynadıklarını gösteren çalışmaları izlemiştir. Bittner 1936 yılında fare meme kanseri virusunu, Gross 1951 yılında fare lösemi virusunu tanımlamışlardır¹.

Günümüze kadar onkolojik potansiyeli üzerinde en çok durulan DNA virusları Adeno viruslar, Herpes viruslar, Papova virusları gruplarına aittirler. Onkojenik potansiyesi olan RNA virusları ise Retro viruslar grubuna dahildirler¹.

Viral onkogeneiz mekanizmalarının aydınlatılması için DNA virusları oldukça iyi modeller oluşturmaktadırlar. Bunlardan Papova virusları ailesine ait Polyoma virusu, SV40 (Simian virus 40) virusu, SV40 benzeri (BK ve JC virusları) viruslar ve Papilloma virusları onkojenik kapasiteleri in vitro ve in vivo olarak en çok incelenmiş viruslardır¹⁻³.

Papilloma virusları çeşitli memelilerde ve insanda, deri ve mukozalarda benign papillomalara neden olmaktadır⁴. Sığırlarda ve tavşanlarda etkili Papilloma virusu türleri, yardımcı faktörlerin de eklenmesi ile mezenseimal kökenli malignan tümör gelişimine yol açarlar⁴. Deri papillomalarında virus enfeksiyonundan sonra, dermal bağ dokusunun proliferasyonu başlamakta, bunu takiben

epidermin hiperkeratinizasyonu görülmektedir¹. Bu tabakalarda, viral kapsid antijenleri ve virus partikülleri elektron mikroskobu ve immünfloresans tekniklerle saptanabilirler. Fakat Papilloma viruslarını hücre kültürlerinde üretmek mümkün olmadığı için çalışmalar hasta materyalleri ile sınırlı kalmaktadır⁴. Papillomaların benign karakterli olanları bir müddet sonra konakçının immün mekanizmaları yardımı ile kendiliğinden yok olmaktadır¹⁻⁴.

Polyoma virusu ise yabancı ve laboratuvarında üretilen fare popülasyonlarında yaygın olarak rastlanan bir virustur. Yeni doğmuş farelere enjekte edildiklerinde çeşitli tipte tümörlere neden olurlar. Yapısal ve morfolojik olarak SV40 virüsüne benzerlik gösterirler¹.

SV40 virüsü ise ilk defa polio virüsü üretiminde kullanılan Rhesus maymunu böbrek hücre kültürlerinden izole edilmiş, Afrika yeşil maymun böbrek hücrelerinde sitopatik etki yaptığı gösterilmiş bir Papova virusudur. Yeni doğmuş hamsterlerde sarkomalara neden olmaktadır¹.

İnsanda BK virüsü ve JC virüsü olarak bilinen ve izole edildikleri hastaların isimleri ile adlandırılan bu iki virüs de SV 40 virüsüne benzerlik gösterir⁵. BK virüsü normalde insanda oldukça yaygındır, immün baskı altındaki hastaların idrarlarında da bol miktarda bulunmaktadır. BK virüsünün yeni doğan hamsterlerde malign tümörler oluşturduğu ve in vitro olarak hücre kültürlerinde (tavşan böbreği, maymun böbreği, sıçan hücreleri, Rhesus maymunu ve BHK21 hamster hücrelerinde) transformasyon yaptığı gösterilmiştir⁵. JC virüsü ilk defa progressif multifokal lökoensefalopati hastalarının beyin dokularından elde edil-

miştir⁵. Bu virus da yeni doğan hamsterlerde oldukça onkojeniktir. Owl maymunlarına enjekte edildiğinde beyin tümörlerine neden olmaktadır. Hücre kültürlerinde transformasyon yaptığı gösterilmemiş ama JC virusunun indüklediği hamster tümörlerinden kurulan hücre dizilerinde JC virusuna özgü bir tümör antijeni görülmüştür⁵.

SV40 virusunun, Polyoma virusunun, SV40 benzeri BK ve JC viruslarının enfekte ettikleri hücrelerde immünpresipitasyon ve immünfloresans yöntemleri ile gösterilen ve birbirlerine benzer yapıda olan tümör antijenleri bulduklarını saptamıştır¹. Tümör antijenleri (T antijenleri) büyük, küçük ve orta T antijenleri olarak molekül ağırlıklarına göre adlandırılırlar¹. Bunlardan büyük T antijeninin çift iplikli DNA 'ya bağlanma özelliği, küçük t antijeninin de protein kinaz aktivitesi gösterdiği bilinmektedir¹. Enfekte hücreler ayrıca perinükleer U antijeni, hücre yüzeylerinde tümöre özgü transplantasyon antijeni (TSTA) ve tümöre özgü yüzey antijeni (TSSA) içerirler¹.

Adeno viruslar insanda akut solunum yolu enfeksiyonlarına sebep olan ve sık görülen viruslardandır⁶. Insandan başka kedi, köpek, sığır, maymun, kuş gibi birçok omurgalı hayvana özgü türleri de vardır. İnsan Adeno virusları hamster ve sıçan fibroblast kültürlerinde transformasyon yaparlar⁶. Bazıları yeni doğmuş hamsterlere enjekte edildiğinde tümör oluştururlar. Transformasyon görülen hücrelerde virus genomunun hepsi veya bir kısmının hücresel DNA 'ya integre olduğu görülmüştür⁶. Bu hücrelerde de 58 KD molekül ağırlığında bir tümör antijeni bulunur¹. Adeno virusların insanda yaygın olarak görülmesine karşın, transforme edici aktiviteleri görülmemiştir^{1,6}.

insan ve diğler birçok omurgalı hayvanda bazı malign tümörlerin indüksiyonunda, EBV 'nun da üye olduğu Herpes virusları grubuna ait virusların rolü olduğunu destekleyen kanıtlar gün geçtikçe artmaktadır. Herpes viruslar grubu içinde yer alan onkojenik potansiyeli olan viruslar çoğunlukla lenfatik dokuları hedef alırlar. Bunun yanında lenfatik doku dışında etkili türleri de vardır. Herpes viruslarının da transformasyon yapma mekanizmaları üzerinde bilgilerimiz henüz yeterli düzeyde değildir, araştırmalar devam etmektedir.

Bu viruslardan Marek hastalığı virusu (MDV) kümes hayvanlarının sinir, içorganlar, kas ve derilerini tutan bir tür lenfomaya neden olur^{7,8}. Hastalık T hücrelerinin tutulması ile karakterizedir. Kümes hayvanları arasında hava yoluyla bulaşan, yatay (horizontal) geçişli bir virustur. Bir Herpes virusunun neden olduğu kesin olarak ispatlanmış doğal olarak bulaşan bir kanser olmasının yanı sıra, aşılama ile önlenebilen ilk kanser türü olması yönleri ile önemlidir^{7,8}.

Leopar kurbağası (Rana pipiens) 'nın Lucké tümörü olarak adlandırılan renal adenokarsinomasının nedeni de bir Herpes virus olan Lucké Herpes virusudur (LHV)⁹. Diğler onkojenik Herpes viruslarının tersine lenfoid sistem dışında etkili olup karsinomalar meydana getirirler. In vivo laboratuvar çalışmaları ile tümörlü dokulardan izole edilen virusun sağlıklı kurbağalarda renal adenokarsinomalara neden olduğu görülmektedir⁹.

Onkojenik Herpes viruslarının bazıları insan dışı primatlar arasında da oldukça yaygındır. Bunlardan HVS (Herpes virus saimiri) ve HVA (Herpes virus ateles), doğal konakçısı yeni dünya maymunları olan T lenfotropik viruslardır^{10,11}.

HVS squirrel maymunlarından (*Saimiri sciureus*) ve HVA spider maymunlarından (*Ateles species*) izole edilmişlerdir. HVS ve HVA verildiğinde cotton - topped marmoset maymunlarında ve owl maymunlarında öldürücü lenfoproliferatif hastalıklara neden olurlar. HVS ve HVA in vitro şartlarda T lenfositleri üzerinde etkili olup onları transforme etme yeteneğine sahiptirler^{10,11}.

İnsan Herpes virusları içinde onkojenik etkilerinden bahsedilen bir virus olan CMV (sitomegalovirus), genito üriner sistemde ve lökositlerde kalıcı (persistent) veya latent enfeksiyon şeklinde bulunabilen ve özellikle immün baskı altındaki hastalarda akut tekrarlamalara neden olan bir insan Herpes virusudur¹². Kolon kanseri, prostat kanseri, servikal kanserler, Kaposi sarkomu gibi birçok insan kanserlerinde tümör dokularına ait hücrelerde CMV suşları, antijenleri veya DNA 'sı bulunduğu gösterilmiştir¹². Özellikle Kaposi sarkomunda ve prostat kanserlerinde, hastalarda CMV 'na karşı antikor cevabı ve hücre sel immünite gelişmektedir¹². Hamster embriyo fibroblastlarında ve primer insan hücrelerinde in vitroda insan CMV 'u ile transformasyon oluşturulmaktadır¹².

Kadınlardaki kanserlerin % 10 'unu oluşturan serviks kanserleri etiolojisinde CMV dışında HSV (Herpes simpleks virus) tip II de düşünülmektedir. Buna servikal kanserli hastaların Papanicolaou yaymalarında bu virusla hücre sel özellikleri değiştirilmiş hücrelerin görülmesi yol açmıştır¹³. Ayrıca serviks kanserli hastalarda HSV tip II 'ye karşı antikor düzeyleri yükselmektedir¹³. Hasta dokularında immünfloresans çalışmaları ile virus antijenlerinin görülmesine rağmen hücrelerde viral nükleik asit olduğunu gösteren veriler yetersizdir¹⁴. HSV tip I ve II in vitro şartlarda hamster doku kültürü hücrelerini

transforme ederler. Bu hücreler hamsterlere verildiklerinde metastaz yapan tümörlere yol açmaktadırlar^{13,14}.

Virusların tümör oluşumunu indükledikleri dokularda ve in vitro şartlarda viruslarla transforme edilen hücrelerde viruslara ait antijenler görülmektedir. Bu antijenler tümör oluşumu sırasında ortaya çıkan proteinler olarak virusa özgüldürler^{15,16}. Hem hücre yüzeyinde, hem de hücre içinde bulunabilen bu viral tümör antijenlerinin ortaya çıkması, tümör oluşan hücrelerde genomik seviyede meydana gelen değişiklikler hakkında bilgi vermeleri açısından önemlidir. Konakçı immün sistemi için antijenik olan bu viral proteinlerin hücresel transformasyonda rolleri olduğu düşünülmektedir. Bu işlemlerini bazı hücresel proteinlerle kompleksler oluşturarak yerine getirdikleri hakkında görüşler vardır. Bu konuda özellikle dikkati çeken bir protein p53 hücresel proteindir¹⁶. Hücresel proteinler viral proteinlerin posttranslasyonel düzeydeki modifikasyonları için gerekmektedir.

Viruslarla indüklenen tümör tiplerinde rastlanan çeşitli viral antijenler gibi, birçok başka tümör tipinde de, hücrenin transformasyonu ile ilgili olarak, değişen ve nedeni bilinmeyen gen ekspresyonundaki farklılıklara bağlı olarak, çeşitli tiplerde antijenik yapılar ortaya çıkmaktadır. Bunlardan en iyi bilinenleri alfa - fetoproteinler ve karsinoembriyonik antijenler gibi onkofötal antijenlerdir¹⁷. Normalde sadece fötal hayatın belli devrelerinde ortaya çıkan bu antijenlerden alfa - fetoproteinler karaciğer kanserlerinde, karsinoembriyonik antijenler de kolon kanserli hastalarda tekrar ortaya çıkmaktadırlar. Bu antijenlerin serum düzeylerinin ölçülmesi klinik takipte yararlıdır^{17,18}.

Onkofötal antijenlerin rutin klinik teşhislerde yararlı bilgiler vermeleri gibi etiyolojisinde viruslardan şüphelenilen kanser türlerinde de viral antijenlerin varlıklarının biyokimyasal ve immünolojik yöntemlerle saptanması tanı ve tedavide yararlı olmakta, hücrelerin transformasyon nedeni ve transformasyon şekli konusunda moleküler düzeyde bilgilerimizi arttırmak için gerekmektedir¹⁵. Bugün her türlü tümöre ve virüslara özgü antijenlere karşı elde edilen monoklonal antikorlardan tanı, tedavi ve metastazların aranması için yararlanmanın yolları araştırılmaktadır¹⁷.

EBV ise insanda, ilgili bulunduğu tümör tipleri, transformasyon yapıcı etkisi ve özellikle de etki ettiği hücrelerde ortaya çıkardığı EBNA (Epstein - Barr çekirdek antijenleri) ile en çok dikkati çeken, insanda etkili Herpes grubu virüslardan birisi durumundadır.

EPSTEIN - BARR VİRUSUNUN ÖZELLİKLERİ

YAPISAL İNCELEMELER İÇİN KULLANILAN VİRUS KAYNAKLARI

Epstein - Barr virusunun özelliklerini incelemek için çok miktarda virusa gerek duyulmaktadır. Bu amaçla kullanılan en iyi kaynaklar EBV üretimi yapan üretken (producer) lenfoblastoid hücre dizileridir. Burkitt lenfomalı hastalardan sağlanan biyopsi parçaları kullanılarak virus üretimi yapan birçok lenfoblastoid hücre dizisi üretilmektedir¹⁹⁻²¹. Bu üretken hücrelerden sağlanan virüslerle veya enfeksiyöz mononükleozisli hastaların boğaz çalkantı suyundan sağlanan virüslerle in vitro şartlarda ölümsüzleştirilebilen ve sınırsız üreme yeteneği kazanan pekçok B lenfoblastoid hücre dizileri de bulunmaktadır.

Bunlardan P3HR-1 hücre dizisi Afrika Burkitt lenfoması kökenlidir. Jijoye hücre dizisinin bir alt suşu olarak üretilmiştir. Bu hücrelerde transformasyon kapasitesi olmayan olgun virus partikülleri salınımı yapılmaktadır¹⁹. B95-8 üretken lenfoblastoid hücre dizisi de virus sağlamak amacı ile çok kullanılan bir kültürdür. Marmoset maymunu lenfosit hücrelerinin, in vitro şartlarda enfeksiyöz mononükleozisli bir hastanın boğaz çalkantı suyundan alınan viruslarla transforme edilmeleri sonucunda üretilmişlerdir. Devamlı olarak transformasyon kapasiteli EBV salınımı yapan bir hücre dizisidir²⁰. Üretken hücre dizileri içinde morfolojik çalışmalarda virus kaynağı olarak kullanılan hücre dizilerinden bir diğeri de EB hücreleridir. Bu hücreler de Afrika Burkitt lenfoması kökenli üretken lenfoblastoid hücrelerdir²¹. Üretken olmayan (non - producer) EBV genomu pozitif lenfoblastoid hücre dizileri de virus çalışmaları için kaynak olmaktadır. Viral genomun latent olarak bulunduğu kanıtlanmış bu hücrelerde bazı kimyasal maddelerin veya EBV 'nun ilavesinden sonra olgun virus partikülü sentezi başlamaktadır²²⁻²⁵. Raji hücre dizisi virus üretiminin bu şekilde indüklenebildiği EBV genomunu latent olarak saklayan, Afrika Burkitt lenfoması kökenli bir dizidir²⁶.

EPSTEIN - BARR VIRUSUNUN YAPISI VE ÜREMESİ

EBV şekil ve kimyasal kompozisyonu ile Herpes virusları grubuna dahildir. Çift iplikli doğrusal bir DNA olan nükleik asidinin üzerini 162 kapsomerden oluşan, ikozahedral simetrik bir kapsid sarar. Nükleokapsidinin etrafını konakçı membranlarından alınmış bir zarf örter^{27,28}. EB-3 hücrelerinde elektron mikroskopu ile yapılan incelemelerde hücre çekirdeğinde ve sitoplazmada görülen hegzagonal profilli olgunlaşmamış partiküller 75 - 80 milimikrondur. Aynı hücre-

lerde içleri boş partiküller yanında, içlerinde yüzük şeklinde veya merkezi yoğun bölgeler şeklinde kor bölgeleri görülen olgunlaşmamış partiküller, viral zarf ile birlikte 110 - 120 milimikron çaplı olgun virus partikülleri de birarada görülebilirler²⁹⁻³¹. Yapılan biyokimyasal analizler sonucunda EBV 'nun zarf proteinlerinin Herpes simpleks virusuna benzediği, zarf yapısında bulunan 33 polipeptidin ortalama 28 - 290 KD molekül ağırlığında olduğu, nükleokapsid proteinlerinin de % 40 'ının ortalama 160 KD molekül ağırlıklı polipeptitlerden oluştuğu saptanmıştır³²⁻³⁴. B95-8 marmoset maymunu üretken lenfoblastoid hücre dizilerinden sağlanmış, EBV olgun virus partikülleri DNA 'sı üzerinde kısıtlayıcı endonükleaz enzimleri ile yapılan haritalama çalışmaları sonunda dört ayrı bölge gösterilmiştir. Bunlar sırasıyla, 1×10^4 KD uzunluğundaki kısa bölge, 2×10^3 KD uzunluğunda 3 - 10 kez tekrarlayan iç tekrar bölgeleri, $8 - 87 \times 10^4$ KD uzunluğundaki uzun bölge ve 3×10^2 KD olan, 1- 10 kopya halinde bulunabilen uç tekrar bölgeleridir³⁵. EBV 'nun B95-8 hücrelerinde üreyen süşunun yapılan sekans çalışmaları sonunda 172.282 baz çiftinden oluşan nükleotid dizileri belirlenmiştir³⁶.

Uç bölgelerde bulunan ve tekrarlayan bazlardan oluşan kısımlar EBV DNA 'sının % 1 'ini teşkil ederler. Viral DNA bu bölgelerden birleşip kovalent bağlar kurarak dairesel formlar oluşturur^{37,38}. EBV ile transforme edilmiş hücrelerde viral DNA 'nın epizomal DNA 'lar olarak, bu dairesel formlarda çoklu kopyalar halinde bulunduğu görülmektedir. Raji hücrelerinde epizomal viral DNA miktarı hücre başına 50 - 60 viral genom, enfeksiyöz mononükleozisli hastaların lenfositlerinden elde edilmiş hücre dizilerinde de 10 - 40 viral genom arasındadır³⁹⁻⁴². EBV ile transforme edilmiş hücrelerde epizomal DNA formları

dışında hücresel DNA 'ya integre olmuş viral genom da bulunmaktadır. Nükleik asit hibridizasyon yöntemleri ile nitroselluloz üzerinde radyoaktif işaretli komplementer RNA (cRNA)-DNA hibridizasyonları yanında, klonlanmış radyoaktif işaretli EBV DNA 'ları kullanılarak hücre yaymalarında gösterilebilen DNA-DNA hibridizasyonlarının yardımı ile viral genomun varlığı saptanabilmektedir⁴³⁻⁴⁵. Integre viral DNA 'nın büyüklüğü ve integrasyon için hücrelerde hangi DNA bölgesinin tercih edildiği konusunda araştırmalar sürdürülmektedir. Bu konuda yapılan bir çalışmada Namalwa Burkitt lenfoması hücre dizisi hücrelerinde dört numaralı kromozomlarda EBV ile ilgili homolog bölgeler saptanmıştır. Bu bölgelerin EBV DNA 'sının üçüncü iç tekrar bölgeleri ile homoloji gösterdiği gözlenmiştir⁴⁶. Burkitt lenfoması hücrelerinde görülen 8. kromozomun 2, 4, 22 numaralı kromozomlarla yaptığı karakteristik resiprokal translokasyon ile EBV DNA 'sının integrasyonu arasında bir ilgi gösterilememiştir⁴⁶⁻⁵⁰. EBV 'nun doğal kaynağı enfeksiyöz mononükleozisli hastalardır. Enfeksiyöz mononükleozisli hastaların boğaz çalkantı suyunda bol miktarda EBV bulunmaktadır⁵¹⁻⁵³. Bu nedenle bulaşmalar damlacık enfeksiyonu ile olmaktadır. Olgun virus partikülleri enfeksiyon için lenforetiküler sistemin B tipi lenfositlerini tercih ederler⁵⁴. Bu sınırlama reseptör seviyesindedir. Virus DNA 'sı mikroenjeksiyonla veya transfeksiyonla aktarıldığında veya yapay (artificial) viral reseptörlerin ilavesinden sonra çeşitli tipte hücrelerde virus replikasyonu ve ekspresyonu görülmektedir⁵⁵⁻⁵⁹. EBV reseptörleri lenfosit grupları içinde sadece B hücrelerinde bulunmaktadır, T hücreleri bu nedenle enfekte edilmemektedir. In vitro şartlarda üretilen, EBV genomu bulunduran bütün lenfoblastoid hücre dizilerinde B hücre yüzeyi özellikleri görülmektedir⁶⁰⁻⁷⁰. Hedef hücrelerde EBV reseptörlerinin durumları kompleman reseptörleri ile yakından ilgi-

lidir. EBV enfeksiyonları için hücre yüzeyinde C3 kompleman reseptörlerinin bulunması gerekmektedir. Bu durum EBV reseptörlerinin kompleman reseptörleri ile yakın yerleşimleri ve yapı benzerlikleri yüzünden olmaktadır^{69,70}. EBV, enfekte ettiği hücrelerde kalıcı (persistent) enfeksiyon yapmaktadır. Latent enfeksiyon dönemine geçmediği dönemlerde litik (productive) enfeksiyon siklusu görülmektedir. Virus üretiminin yapıldığı litik enfeksiyon dönemlerinde EBV 'nun replikasyon siklusunu, uygun hücre sistemi olmadığı için in vitro şartlarda, başından sonuna kadar izlemek zor olmaktadır. EBV 'nun replikasyon kademelerini izlemek amacı ile virus üretimi için uyarılmış, EBV genomu pozitif lenfoblastoid hücre dizilerinden yararlanılmaktadır. P3HR-1 hücrelerinden sağlanan viruslarla enfekte edilen Raji hücrelerinde virus salınımı başlatılarak replikasyonun hem erken hem de geç fazları izlenebilmektedir⁷¹. Süperenfeksiyon sırasında yapılan gözlemlere göre EBV, tutunduğu reseptör bölgesinden füzyon ile, nükleokapsid olarak alınır. Geçiş sırasında viral zarf, hücre membranı içinde kaybolur. Nadiren viropeksis mekanizmaları ile hücre membranının içeri çökmesi şeklinde (invaginasyon) virusun sitoplazmaya girmesi mümkündür. Sitoplazmaya giren nükleokapsidin yıkılması sonucu ayrılan viral DNA çekirdek zarı porlarından içeri girer ve replikasyon işlemleri çekirdekte devam eder. Olgun virus partiküllerinin çekirdekten çıkmaları enfeksiyonun yedinci saatinden sonra başlamaktadır. Elektron mikroskopik takiplerde, çekirdek membranından, golgi ve sitoplazmik vezikül membranlarından zarf alan partiküllerin yanında çekirdek zarının mitoz nedeni ile dağılması sonucu çekirdekten zarf alamadan çıkan ve hücre membranından zarf alan olgun partiküller de görülmektedir. Bu işlemler süresi içinde hücrelerde özellikle EA (erken antijenler) ve VCA (viral kapsid antijenleri) bulunduğu saptanmaktadır. EBV da diğer Herpes viruslarda olduğu gibi repli-

kasyon siklusunun başında viral DNA sentezi için gerekli enzimlerin yapımını başlatır. Bu hücrelerde DNAaz ve timidin kinaz enzimleri aktiviteleri yanında yeni viral DNA polimeraz enziminin sentezi de görülür⁷²⁻⁷⁵. Sentezi yapılan yeni viral DNA polimeraz, kromatografi özellikleri, tuz hassasiyeti, sıcaklığa duyarlılık ve kimyasal inhibitörlerden etkilenme gibi konularda hücresele DNA polimeraz enzimlerinden farklıdır⁷³.

Viral DNA polimeraz konusunda dikkati çeken bir durum epizomal formların replikasyonu konusundadır. Çünkü üretken olmayan hücre dizilerinde viral DNA polimeraz aktivitesi görülmez ve epizomal formlar hücrenin S fazında hücresele DNA polimeraz aracılığı ile replike olurlar⁷²⁻⁷⁶.

EBV İLE IN VITRO LENFOPROLİFERASYONUN İNDÜKLENMESİ

Epstein - Barr virusunun en önemli biyolojik özelliklerinden birisi fetal kord kanı B hücrelerini, seronegatif veya pozitif kişilerin dolaşım kanı B hücrelerini in vitro şartlarda ölümsüzleştirerek (immortalization) devamlı üreyen hücre dizileri haline getirebilmesidir. Normal insan dolaşım kanı lenfositleri in vitro şartlarda devamlı üreyen hücre dizileri haline getirilememektedir⁷⁸⁻⁸². İnsan dışı primatlardan yeni dünya maymunlarının (squirrel, cotton - top, owl, cebus cinsi maymunlar) dolaşım kanı B lenfositleri de EBV ile transforme edilip devamlı hücre dizileri halinde in vitro şartlara adapte olabilmektedirler⁸³⁻⁸⁵.

EBV 'NUN İNSAN DIŞI PRİMATLARDA DENEYSEL KARSİNOJENİK ETKİSİ

Epstein - Barr virusu owl maymunlarına ve marmoset maymunlarına inoküle edil-

diğinde öldürücü, malignant retiküloproliferatif hastalıklara neden olmaktadır⁸⁶⁻⁹¹. Oluşan tümörler monoklonal tiplidir⁹⁰. Tümör materyallerinde EBV DNA 'sı bulunmaktadır^{88,89}.

EPSTEIN - BARR VİRUSUNUN EPİDEMİYOLOJİSİ VE ENFEKSİYONLARI

Epstein - Barr virusu hem insanda hem de diğer primatlarda önemli lenfoproliferatif hastalıkların etiyolojik nedeni olarak bilinmektedir. Bugün insanda Burkitt lenfomasının, nazofarengeal karsinomanın ve enfeksiyöz mononükleozisin etiyolojisinde rolü saptanmıştır.

EPSTEIN - BARR VİRUSUNUN BURKITT LENFOMASI İLE İLİŞKİSİ

Epstein - Barr virusunun varlığı ilk kez, Burkitt lenfomasının etiyolojisi konusunda yapılan çalışmalar sırasında ortaya çıkarılmıştır. İngiliz cerrahı Dennis Burkitt 'in adını alan bu malign lenfoma türü Afrika 'da Uganda bölgesinde, iklimsel ve coğrafik özellikleri ile malarya enfeksiyonlarının da yaygın şekilde görüldüğü bir bölgede, çocukluk çağında çok rastlanan bir hastalık olarak dikkati çekmiştir⁹²⁻⁹⁴. M. A. Epstein ve Y. M. Barr²¹, Burkitt lenfomasının etiyolojisi konusundaki araştırmalara katkıda bulunmak amacı ile Uganda 'da görülen bu lenfoma türüne ait biyopsi hücrelerinden hücre kültürü çalışmalarını başlatmışlar ve EB lenfoblastoid hücre dizisini elde etmeyi başarmışlardır. Bu Burkitt lenfoma kültür hücrelerinde yapılan elektron mikroskopu incelemeleri ile de aynı araştırmacılar Herpes grubu viruslarına benzeyen, büyüklükçe 110 - 115 milimikron olan ve bu boyutları ile bilinen diğer Herpes viruslarından daha küçük olan olgun virus partiküllerinin varlığını rapor et-

mişlerdir⁹⁵. Bu viral partiküller daha sonra kendilerini ilk kez bulan bilim adamlarının adları ile anılmaya başlamıştır. Epstein - Barr virusunun Burkitt lenfomasının etiolojisinde etken olup olmadığı konusundaki sorulara cevap aramak için yapılan seroepidemiyolojik çalışmalarla, Burkitt lenfoması ve kontrol grubu hastaların serumlarında, bu virus antijenlerine karşı oluşan antikörlerin varlığı araştırılarak, Afrika 'da bu hastalığın yaygın olduğu bölgelerde hastaların % 87 'sinde EBV 'na karşı oluşan antikörlerin 1:160 gibi yüksek titrelere oldukları saptanmıştır⁹⁶. George Klein ve B. M. Reedman⁹⁷'in antikompleman immünfloresans tekniğini geliştirmeleri ile EBV 'na ait antijenlerden çekirdek antijenlerinin varlığı, Raji kültür hücrelerinde gösterilmiştir. EBNA (Epstein - Barr çekirdek antijenleri) ancak ACIF (anti - kompleman immünfloresans) tekniğinin gelişmesinden sonra saptanabilmişlerdir. EBV 'nun varlığına kesin kanıt olan bu antijenlerin gösterilmesi ile seroepidemiyolojik çalışmalar kolaylaşmıştır. Bu aşamada Burkitt lenfoması taze biyopsi hücrelerinde EBNA 'lerinin kompleman fiksasyon ve ACIF teknikleri ile gösterilmeleri, EBV 'nun BL 'daki etiolojik etkisinin araştırılmasında önemli bir adım olmuş, Nairobi 'li 13 hastanın 11 'inde lenf nodu biyopsilerinde tümör hücrelerinin EBNA pozitif reaksiyon verdiği gösterilmiştir⁹⁸. Afrika Burkitt lenfoması biyopsi hücrelerinde daha ileri bir çalışma ile EBV DNA 'sı nükleik asit hibridizasyon yöntemleri ile gösterilmiş ve bu hücrelerin aynı zamanda EBNA pozitif oldukları saptanmıştır. Bu biyopsilerde viral partiküllere rastlanmamıştır⁹⁹. BL 'nın endemik olduğu Tropik Afrika 'da Uganda bölgesinde Burkitt lenfoması ve Burkitt lenfoması dışındaki hastalardan alınan biyopsilerde karşılaştırmalı olarak yapılan EBNA çalışmaları ile BL 'lı 34 hastanın 27 'sinde genom pozitif bulunmuştur. Her hücrede ortalama 39 viral genom

gösterilmiştir. Bu durum Tropik Doğu Afrika 'da görülen her BL vakasının % 97 oranında genom pozitif olduğunu göstermiştir. Bölgede yaygın olarak görülen malya enfeksiyonları da yardımcı bir faktör olarak tümör gelişimini indüklemektedir. Endemik bölge içinde Burkitt lenfoması dışındaki vakalar ise EBNA negatif bulunmaktadır. EBNA bu durumda BL 'ları diğerlerinden ayırıcı tanı kriteri olmaktadır¹⁰⁰. Aynı bölgede yapılan prospektif seroepidemiolojik bir çalışma sonucuna göre, 1971 - 1977 yılları arasında takibe alınan ve EBV yapısal antijenlerine karşı antikor düzeyleri yüksek çocuklar, BL geliştirme riski çok olan vakaları oluşturmaktadırlar¹⁰¹. Bölgede 42.000 serum çalışılmış ve 1:1000 vakada BL gelişmiştir. Bu vakalarda çalışmanın başlangıcında özellikle viral kapsid antijenlerinin düzeyi yüksek bulunmuştur. BL geliştirme yönünden risk altında bulunan çocuklarda VCA 'lerine karşı oluşan antikorlar normal bireylere göre 30 kez yüksektir¹⁰¹. Endemik olmayan bölgelerden Kuzey Afrika 'da Cezayir 'de çocukluk çağı BL 'larının % 60 'ını oluşturan ve karın bölgesini tutan BL 'da da EBV antikor düzeyleri yüksektir ve biyopsilerde hücreler genom pozitif bulunmaktadır¹⁰². İsrail 'de de BL 'lı çocuk hastalardan bir vakada yapılan genom araştırmasında biyopsi hücreleri pozitif bulunmuş ve hücre başına 82 genomun varlığı saptanmıştır¹⁰³. Endemik bölge dışında görülen sporadik EBV pozitif BL vakaları Amerika 'dan ve Avrupa 'dan bildirilmektedir¹⁰⁴. % 10 oranında görülen pozitif vakaların dışında bu BL 'larda biyopsi materyali hücrelerinde nükleik asit hibridizasyon ve ACIF teknikleri negatif sonuç vermektedir¹⁰⁴⁻¹⁰⁵.

EPSTEIN - BARR VIRUSUNUN NAZOFARENGEAL KARSİNOMA İLE OLAN İLİŞKİSİ

Werner Henle ve Gertrude Henle¹⁰⁶ grubunun yaptığı bir serolojik çalışmada Doğu Afrika 'da ve Çin 'de bulunan nazofarengeal karsinomalı hastaların % 84'ünde anti - EBV antikor düzeyleri 1:160 gibi yüksek düzeylerde bulunmuştur. EBV 'nun nazofarengeal karsinoma ile de ilgili olabileceği konusuna bu çalışma ile dikkatler çekilmiştir. Dünyanın çeşitli yerlerinde görülen nazofarengeal karsinomalarda EBV 'na ait VCA 'lerine MA (membran antijenleri) 'ne ve EA 'lere yüksek düzeylerde antikor cevabı gelişmektedir. Amerika 'da yapılan bir çalışmada bu hastalarda serum düzeylerindeki artışa paralel olarak tümör dokularında da EBNA çekirdek antijenlerinin bulunduğu görülmüştür¹⁰⁷. Nazofarengeal karsinomada EBNA 'nin pozitif olması EBV 'nun tümör etiyojisindeki yerine ve lenfotropik özelliğine yeni bir görüş getirmiştir. Nairobi 'li hastalarda yapılan nükleik asit hibridizasyon çalışmalarında az farklılaşmış nazofarengeal karsinomaya ait tümör hücrelerinde EBV DNA 'sı gösterilmiştir. Nazofarengeal karsinoma ile EBV arasındaki ilişkinin BL 'dan farklı olarak hastalığın yayılım yeri ve görülme sıklığı ile değişmediği anlaşılmıştır. Başlangıçta, NPC 'li hastalardan alınan biyopsilerdeki histopatolojik yapının çok karmaşık olması ve orijinal doku örneklerinde lenfosit infiltrasyonunun varlığı, EBV taşıyan hücrelerin orijini konusunda belirsizlik yaratmıştır. Bu orijinal dokulardan alınan örneklerin deney farelerinde geliştirdikleri ve lenfosit infiltrasyonunun olmadığı saptanan tümörlerden malignant epitel hücrelerinin EBV provirusu bulundurduğu anlaşılmıştır¹⁰⁸. Bu durumda B tipi lenfositlerin dışında nazofarenks yüzey epitelinden gelişen az farklılaşmış nazofarengeal karsinomada da EBV genomunun varlığı kanıtlanmıştır. Gerçekten de EBV enfeksiyonlarının doğal kaynağı olan enfeksiyöz mononükleozisli

hastalarda boğaz çalkantı suyunda görülen virusların ürettiği hücreler orofarengeal ve nazofarengeal boşluklarda yerleşik epitel hücre popülasyonlarıdır. Bu hücreler EBV reseptörü bulundurulur ve bu nedenle EBV enfeksiyonlarına hassasiyet göstermektedirler¹⁰⁹⁻¹¹¹. EBV DNA 'sının NPC 'lı tümör biyopsilerindeki epitel tipli hücrelerde olduğunu gösteren ve EBV DNA 'sı içeren NPC 'lı hastaların coğrafik dağılımlarını inceleyen bir diğer araştırma da Singapur, Tunus ve Kenya 'lı hastalar üzerinde yapılmıştır. Bu çalışmada da EBV DNA 'sının epitel tümör hücrelerinde mevcut olduğu ve değişik coğrafik bölgeler arasında fark bulunmadığı saptanmıştır¹¹². Çin 'de yapılan seroepidemioloji çalışmalarında da NPC 'lı hastalarda EBNA antikor düzeyi ve diğer yapısal antijenlere karşı gelişen antikor düzeyleri artmaktadır. Bu artışlar hastalığın derecesi ile ilgili bulunmaktadır. Hastalarda hastalığın ilk evresinde erken antijenler normal bireylere göre (15) kat yüksektir. Hastalığın üçüncü evresinde EA 'lere karşı antikor düzeyleri birden bire artmaktadır. Bu özellik NPC 'nin gelişiminin değerlendirilmesinde yararlı olmaktadır¹¹³.

EPSTEIN - BARR VIRUSUNUN ENFEKSİYÖZ MONONÜKLEOZİSLE OLAN İLİŞKİSİ

G. Henle ve W. Henle¹¹⁴⁻¹¹⁵ Burkitt lenfoması hücre dizilerinde antijenik yapıların incelenebilmesi için immünfloresans çalışmaları geliştirirlerken uyguladıkları indirekt immünfloresans teknikleri ile bu hücrelerde görülen EBV 'nun enfeksiyöz mononükleozis ile ilişkisini ortaya çıkarmışlardır. EBV antijenlerine karşı oluşan antikorlar, enfeksiyöz mononükleozisli hastalarda yüksek düzeydedir. EBV antikor düzeyleri ile heterofil antikor düzeyleri arasında da paralel sonuçlar alınmaktadır¹¹⁵⁻¹¹⁶. Enfeksiyöz mononükleozis (IM), EBV 'nun sebep olduğu oldukça yaygın görülen bir enfeksiyon çeşididir.

Doğal olarak genellikle klinik bulgu vermeden çocuklarda seyrederek ve daima virusa özgü antijenlere karşı antikorların geliştiği serolojik cevapla beraber gizli enfeksiyon yapar. Bu immün cevap tekrar gelişen enfeksiyonlar için kalıcıdır. Gelişmiş ülkelerde popülasyonun en fazla % 80 - 90 kadarı enfeksiyonu geçirmiş iken, gelişmekte olan ülkelerde çocukların % 99.9 'u üç yaşından önce enfeksiyonu geçirmektedir¹⁰¹⁻¹¹⁷. EBNA 'ne karşı enfeksiyöz mononükleozisde antikor cevabının yükselmesi EBNA 'nin hastalık süresince virusun etkilediği lenfositlerde sentezlendiğini göstermektedir. Bu antijenin varlığı lenfositlerin transformasyonu ile ilgilidir. Enfeksiyöz mononükleozisli hastaların dolaşım kanına ait total hücrelerin $10^5 - 10^6$ 'sı EBV ile transforme durumdadır. Hastalarda gelişen antikor cevabının şiddeti bu transforme hücre miktarına bağlıdır ve enfeksiyöz mononükleozisli hastalarda konakçı hücre sel immün cevabı ile yok edilen bu hücrelerdeki EBNA antikor üretimini stimüle etmektedir¹¹⁸⁻¹²⁰.

EPSTEIN - BARR VIRUSU İLE İLGİLİ OLAN DİĞER NEOPLAZMLAR

Kronik myeloblastik lösemide (CML) ve kronik lenfositik lösemide (CLL), sarkoidozis ve Hodgkin hastalığında, Kaposi sarkomu vakalarında EBV 'na karşı antikor düzeyleri yükselmektedir. Bu hastaların bütün hasta materyallerinde EBV DNA 'sına nükleik asit hibridizasyon yöntemleri ile bakılmış ama genom varlığı gösterilememiştir^{90,121,122}. Bunlarda immünitinin azalması nedeni ile antikor düzeyleri yükselmektedir^{123,124}. Waldeyer halkasında yerleşik karsinoma vakalarında serolojik cevapların yanında, hücrelerde EBV genomu da bulunmaktadır. Bu çalışmalarda nükleik asit hibridizasyon yöntemleri

kullanılmıştır¹²⁵. Burun boşluğunun, az farklılaşmış karsinomalarında da EBNA pozitif hücreler vardır. Hastalarda EBV 'na karşı seropozitif cevaplar alınmaktadır¹⁰⁷. Tükürük bezi tümörlerinde de bazı vakalarda biyopsi hücrelerinde EBV varlığı gösterilmektedir¹²⁶. İmmünoblastik lenfadenopatili iki vakada EBV DNA 'sı nükleik asit hibridizasyon teknikleri ile gösterilmişlerdir¹²⁷. X 'e bağlı lenfoproliferatif hastalıklarda, doku transplantasyonu yapılan ve immün baskılayıcı ilaç kullanımında lenfoma oluşma riski 100 kat fazladır. Bu vakalarda EBV ile ilgili reaksiyonlar bulunmaktadır¹²⁸⁻¹⁴¹.

EPSTEIN - BARR VİRUSU İLE İLGİLİ ANTİJENLER

EBV 'nun üretildiği, üretken hücre dizilerine ait hücrelerde görülen ve immün-floresans yöntemleri ile incelenebilen EBV antijenleri MA (membran antijenleri), EA (erken antijenler), EBNA (çekirdek antijenleri) ve VCA (viral kapsid antijenleri) olmak üzere başlıca dört grupta incelenmektedirler (Şekil 1).

VİRAL KAPSİD ANTİJENLERİ

EBV viral kapsid antijenleri üretken lenfoblastoid hücre dizilerinde immün-floresans yöntemlerle gösterilen ilk EBV antijenidir¹¹⁴. VCA viral genomun, enfekte hücrelerdeki geç ürünlerindedir. Raji hücrelerinin, P3HR-1 virusu ile süperenfeksiyonundan sonra, bu hücrelerde başlayan viral replikasyonun son devresinde ortaya çıkmaktadırlar¹⁴². Biyokimyasal analizlerle en büyük kapsid proteinin 160 KD molekül ağırlıklı olduğu saptanmıştır³⁴. Primer EBV enfeksiyonlarında, VCA 'lere karşı gelişen antikorlar bireyin hayatı boyunca kalıcıdır ve anti - VCA IgG 'lerin düzeyi 1:10 ile 1:160 arasında değişmek-

tedir¹¹⁴.

MEMBRAN ANTİJENLERİ

Membran antijenleri süspansiyon kültür hücrelerinde üreyen bütün genom pozitif lenfoblastoid hücre dizilerindeki hücrelerde, direkt veya indirekt immünfloresans tekniklerle gösterilmektedirler. Erken membran antijenleri ve geç membran antijenleri olarak iki ayrı grup halinde üretilirler. EMA (erken membran antijenleri) viral genomun erken devre ürünlerindedirler ve virus DNA 'sının sentezinden önce ortaya çıkarlar. LMA (geç membran antijenleri) viral genomun geç devre ürünlerindedirler ve viral DNA sentezinden sonra ortaya çıkarlar^{143,144}. Membran antijenleri olgun virusun zarf yapısında yer alırlar¹⁴⁵. Aktif olarak virus üretiminin görüldüğü B hücrelerinin yüzeyinde hemen membran antijenleri belirir. Bu antijenlerin yapılan biyokimyasal analizlerle yaklaşık 340 KD, 250 KD, 160 KD ve 70 KD molekül ağırlıklarında oldukları saptanmıştır¹⁴⁶⁻¹⁵⁰.

ERKEN ANTİJENLER

EBV erken antijenleri, VCA 'leri pozitif olan bütün virus üretken hücrelerde vardır. Daha çok süperenfeksiyondan sonra litik sıklusa giren ve virus üretimine başlayan hücrelerin ürünüdür¹⁵¹. Erken antijenlerin D (diffuse) ve R (restricted) bileşenleri olmak üzere iki ayrı bileşeni vardır. Bu bileşenler arasında immünfloresan boyama ve metanol fiksasyonu konularında farklılıklar bulunur. Erken antijenlerin D bileşeni hem nükleusta hem de sitoplazmada bulunur. Metanol ile fiksasyona dayanıklıdır. R bileşeni ise sadece sitoplazmada bulunur ve metanolde denatüre olur¹⁵¹. Erken antijenler viral

genomun erken ürünlerinden olup, viral DNA sentezinden önce ortaya çıkarlar¹⁵². Erken antijenlerin ortaya çıkmaları ile litik sıklusa geçildiği anlaşılmaktadır. Sağlam virus taşıyıcıların da EA 'lere karşı gelişen antikor düzeyleri 1:20 gibi düşük düzeylerde dir. Enfeksiyöz mononükleozisli hastalarda D komponentine karşı gelişen antikorlar, hastalıktan sonra hastaların % 85 'inde kaybolur^{153,154}. Nazofarengeal karsinomalı hastalarda, hastalığın son evresinde hem D bileşenine hem de R bileşenine karşı olan antikor düzeyleri artmaktadır¹⁴⁵. Anti-D ve anti-R antikorlarının ortaya çıkışı EBV kalıcı enfeksiyonunun, aktive olarak bir ileri evreye geçtiğini göstermektedir. EA 'lerin takibi bununla hastalıkların gelişimi konusunda fikir verici yönde olmaktadır.

LYDMA ANTİJENLERİ

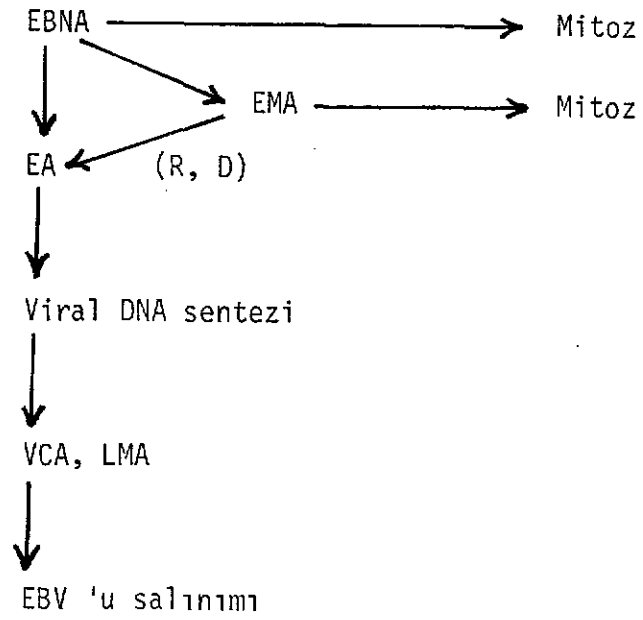
LYDMA (Lymphocyte detected membran antigens) olarak adlandırılan antijen kompleksi latent siklusun görüldüğü hücrelerde EBNA dışındaki tek EBV genomu ürünüdür¹⁵⁵. Biyokimyasal yapısı henüz belirlenememiş olan LYDMA 'nin varlığı ancak sitotoksinite testleri ile gösterilebilmektedir^{155,156}. Latent enfeksiyon boyunca bu antijenin fonksiyonunun ne olduğu bilinmemektedir.

EPSTEIN - BARR VİRUSU ÇEKİRDEK ANTİJENLERİ

EBNA (Epstein - Barr çekirdek antijenleri) ilk kez Reedman ve Klein⁹⁷'nin uyguladıkları ACIF (anti - kompleman immünfloresans) tekniği ile gösterilmiştir. Bu testle EBV genomu pozitif birçok hücre dizisinde karakteristik çekirdek floresansı saptanmış, EBV genomu bulundurmayan dizi hücrelerinde

aynı test negatif sonuç vermiştir¹⁵⁸. EBNA, taze BL biyopsi hücrelerinde, NPC 'lı hastaların biyopsilerinden alınan epitel tipli hücrelerde ve enfeksiyöz mononükleozisli hastaların dolaşım kanındaki B hücrelerinde bulunan EBV 'na ait çekirdek antijenidir¹⁵⁹⁻¹⁶². EBNA 'nin viral genomun ürünü olduğuna kanıt olarak, EBV genomu bulunduran her hücrede EBV DNA kopyalarının sayısı ile nükleusta yerleşik EBNA miktarı arasındaki doğrusal ilişki gösterilmektedir^{163,164}. Ayrıca klonlanmış EBNA geni transferleri ile EBV genomu negatif hücrelerde EBNA ekspresyonu görülmektedir¹⁶⁵. EBNA 'nin fonksiyonu konusundaki araştırmalar devam etmektedir. EBV ile enfekte hücrelerde virus tarafından sentezlenen bir ürün olarak B hücrelerinin transformasyonunda ve blast formuna dönüşlerinde düzenleyici rol oynamakta, latent enfeksiyona geçiş için önemli bir yeri olduğu düşünülmektedir¹⁶⁶. EBNA antijeni çift iplikli DNA moleküllerine yüksek afinite ile bağlanma özelliği göstermekte ve bu özelliği ile Raji hücreleri metafaz kromozomlarında EBNA pozitif reaksiyon alınmaktadır¹⁶⁷. EBNA 'nin hücre DNA 'sı ile olan bu yakın ilişkisi onun regülasyon ve malign transformasyondaki etkisini destekleyen özelliklerindedir. Yapılan biyokimyasal çalışmalarla özellikleri araştırılan EBNA 'nin molekül ağırlığı ve biyokimyasal yapısı konularında saflaştırma çalışmalarından farklı sonuçlar alınmıştır. Bu sonuçlara göre Matsuo ve arkadaşları¹⁶⁸ 100, 70 ve 50 kilodaltonluk alt birimlerden oluşan üçlü bir kompleks yapısı öne sürmüşlerdir. Luka¹⁶⁹ ve arkadaşları 48 kilodaltonluk dört alt birimden oluşan 170 - 200 KD 'luk bir tetramer yapısı saptamışlardır. Sculley¹⁷⁰ ve arkadaşlarının daha sonra yaptıkları bir çalışma sonucuna göre EBNA 'nin iki ayrı antijen olduğu ve bunların da molekül ağırlıklarının 65 ve 70 kilodalton olarak saptandığı bildirilmiştir. İlerleyen tekniklerle, EBV genomunun, nükleer anti-

jenlere ait Bam - HIK parçasının ekspresyonuna bakılarak gerçekten de iki ayrı antijenin sentezi gösterilebilmiştir¹⁷¹. Bu iki ayrı antijenik yapıdan M olarak isimlendirilen antijen Raji hücrelerinde kromozomlara bağlı olmadan çekirdekte bulunmakta, K antijeni de metafaz kromozomlarına bağlanmaktadır. Primer EBV enfeksiyonlarında EBNA 'ne karşı gelişen IgG düzeyi 1:10 ile 1:160 arasında değişmektedir^{116,118}.



Şekil 1 : Üretken (productive) viral siklus sırasında immünfloresans tekniklerle incelenebilen EBV ile ilgili antijenler.

EBNA, Epstein - Barr çekirdek antijenleri; EMA, erken membran antijenleri; R ve D, erken antijenlerin bileşenleri; EA, erken antijenler; LMA, geç membran antijenleri.

MATERYAL VE METOD

TESTTE KULLANILAN HÜCRELER

LENF NODU BİYOPSİLERİ

Teste alınan hücreler, Hacettepe Çocuk Hastanesi Onkoloji Bölümü 'nden ve Hacettepe Hastanesi Dahiliye Bölümü 'nden lenf nodu biyopsisi için ameliyata gönderilen 19 hastanın biyopsi parçalarından elde edildi. Ameliyattan hemen sonra steril petri kabı içinde Çocuk Hastanesi Patoloji Laboratuvarı 'na götürülen parçaların bir kısmı patoloji çalışmaları için formole alınırken, bir kısmı da laboratuvarımıza getirildi. Bekletilmeden % 10 fetal dana serumlu (Gibco, Europe) RPMI - 1640 (Sigma Chemical Company) besi ortamı içine alınan taze dokudan ayrılan hücrelerden, klinik tanı, patoloji sonucu ile doğrulanmadan hücre yaymaları hazırlandı ve ACIF (anti - kompleman immünfloresans) testi ile EBNA (Epstein - Barr çekirdek antijenleri) 'ne bakıldı.

HÜCRE DİZİLERİ (CELL LINE)

Uygulanan anti - kompleman immünfloresans tekniğinde kontrol olarak EBV üretimi olmayan (non - producer) iki lenfoblastoid hücre dizisi kullanılmıştır. Bunlar pozitif kontrol olarak EBV genomu yönünden pozitif bir hücre dizisi olan Afrika Burkitt lenfoması kökenli Raji hücreleri ve negatif hücre kontrolü olarak da EBV genomu yönünden negatif bir hücre dizisi olan, Amerika Burkitt lenfoması kökenli Ramos hücreleridir. Kontrol hücreler İtalya 'dan, Roma Üniversitesi Viroloji Laboratuvarından, Dr. Giovanni Rocchi tarafından sağlanmıştır.

KONTROL HÜCRE DİZİLERİNİN KÜLTÜR ŞARTLARI

İki lenfoblastoid hücre dizisi de (Raji ve Ramos) süspansiyon hücre kültürü olarak üretildiler. Kültür kabı olarak polystrene doku kültür kapları (Corning, New York, U.S.A.) ve cam kültür şişeleri (Kimax, U.S.A.) kullanıldı. Hücre beslemelerinde pH:7.4 olan, 100ü/ml penisilin G potasyum ve 100mcg/ml streptomisin sulfat (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A.) içeren % 20 fotal dana serumlu, steril RPMI - 1640 besi ortamı kullanıldı. Ortamın pH sı aside kaydıkça besi ortamı tazelendi. Beslemeler sırasında hücreler steril santrifüj tüplerine aktarıldılar. 1000 RPM 'de 10 dakika santrifüj edildiler (Damon/IEC, K tipi santrifüj). Üstte kalan besi ortamı atıldı. Hücreler taze besi ortamı içinde kültür kaplarına aktarıldılar. Hücre sayısı yaklaşık 1×10^6 /ml olduğunda pasaj yapıldı. Pasajlardan önce ve sonra hücrelerin canlılığı ve sayısı tripan mavisi (Trypan blue) ile boyanarak kontrol edildi. Tripan mavisi canlılık testi aşağıda belirtilen şekilde uygulandı:

Stok boya solüsyonları:

- Tripan mavisi: % 0.2 (w / v), distile suda hazırlandı.
- 5X solusyonu : % 4.25 NaCl (w / v), distile suda hazırlandı.

CANLILIK TESTİNİN YAPILIŞI

Boyama sırasında stok solusyonlar (% 4.25 'lik NaCl: % 0.2 tripan mavisi) 1:4 oranında karıştırıldı. Bu karışım hücre süspansiyonuna 1:1 (hücre süspansiyonu:tripan mavisi son solusyonu) oranında ilave edildi. Sayımlar bu son süspansiyon için Hemositometre yardımı ile yapıldı. Boya alan hücreler ölü olarak değerlendirildi. Hücre sayıları üç dakika içinde tesbit edildi.

Canlı hücre sayısı ve yüzdesi:

Canlı hücre sayısı / ml : ortalama canlı hücre sayısı $\times 10^4$ /ml $\times 1$ /sulandırım

$$\% \text{ canlı hücreler} = \frac{\text{canlı hücreler}}{\text{canlı hücreler} + \text{ölü hücreler}} \times 100$$

formülleri ile hesaplandı. Canlılığın % 70 'in altında olduğu görülen kültürlerde ölü hücreler Ficoll - Hypaque (Histopaque, Sigma Chemical Company) gradienti ile uzaklaştırıldı. Histopaque üzerine alınan hücreler (1:4, Ficoll-Hypaque:hücre süspansiyonu) 1640 RPM 'de 20 dakika santrifüj edildiler. Ara fazdaki canlı hücreler yeni ortam içine alınıp 20 dakika 1000 RPM 'de bir kez yıkandılar ve daha sonra kültür kaplarına aktarılarak inkübasyon için % 5 CO₂ içeren etüve bırakıldılar. Kümeleşen hücreleri ayırmak için kültür şişeleri günde iki kez çalkalandı.

HÜCRE YAYMALARININ HAZIRLANMASI

Lenf nodu biyopsilerinden alınan doku parçaları % 10 fetal dana serumlu RPMI-1640 besi ortamı içinde çalkalanarak yıkandılar. Eritrositlerin bu şekilde kabaca uzaklaştırılmasından sonra, kapsül artıkları ve nekrozlu kısımlar da makas veya bistüri yardımı ile dokudan ayrıldılar. Hücreleri ayırmak için kullanılan elekler (pirinç telden yapılmış, por alanları $6.2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2$) üzerinde, mekanik hareketlerle (sürtme) hücreler, yine petri kabındaki besi ortamı içine döküldüler. Bu hücreler bekletilmeden konik dereceli santrifüj tüplerine aktarılarak, iki kez % 10 fetal dana serumlu RPMI - 1640 içinde, iki kez de dengeli tuz solusyonunda (% 0.8NaCl, % 0.014CaCl₂, % 0.04KCl, % 0.02MgSO₄, 7H₂O,

% 0.06KH₂PO₄, % 0.06Na₂HPO₄, Ph:6.9) yıkandılar. Yıkama işlemleri 10 'ar dakika 1000 RPM 'de yapıldı. Yıkamalar sonunda hücrelere canlılık testi uygulandı. Canlılığın ortalama % 40 - 50 arasında olduğu biyopsi hücreleri fiksasyona alındı. Hücre sayımı sonunda belirlenen miktardan, 2 - 4 x 10⁶/ml hücre fiksasyon için ayrıldı. Bu miktar hücre üzerine ince uçlu pastör pipeti ile 4 damla fötal dana serumu ilave edildi. Üzeri hipotonik solusyon ile (30 mM gliserol, 1.0 mN CaCl₂, 0.8 mN MgCl, Ph:7, steril) bir ml 'ye tamamlandı. İnce uçlu pastör pipeti yardımı ile birkaç kez hafifçe pipetlenen hücreler lamlar üzerine damlatıldı. Lamlar fiksasyondan önce % 70 'lik alkol ile iyice silinip kurulandı. Pastör pipetinin ucundaki damlalardan her lama bir damla olacak şekilde dağıtım yapıldı. Lamlar üzerinde oluşan sıvı bombelik pipet yardımı ile tekrar geri çekildi. Daha sonra yaymaların kuruması için oda sıcaklığında 30 - 60 dakika beklendi. İyice kuruyan preparatlar hemen -20⁰C 'deki aseton : metil alkol (2:1) karışımında 5 dakika fiksedildiler. Fiksasyondan sonra bütün preparatlar -50⁰C 'e kaldırıldılar.

TESTTE KULLANILAN SERUMLAR

Testte EBV antikorları negatif ve pozitif serumlar kullanıldı. Başlangıçta Stockholm Karolinska Enstitüsü 'nden Dr. George Klein tarafından gönderilen serumlarla (EBNA antikor düzeyi 1/80 olan pozitif serum (K. FALK), kompleman kaynağı olarak da kullanılan negatif serum (I. ERNBERG) ve FITC (Fluorescein isothiocyanate) bağlı anti-C3 insan serumu (Datopatts) çalışıldı. Testin devamında EBNA antikor titresi 1/40 olarak tesbit edilen sağlam bir denekten donör olarak yararlanıldı. Negatif serum temini için H. O. Çocuk Hastanesi Ortopedi Bölümü 'nde yatan 1 - 3 yaş grubu çocuklardan serum alındı.

EBNA antikoru negatif olanlar negatif serum ve kompleman kaynağı olarak kullanıldı. Anti - kompleman serum olarak, FITC bağlı anti-C3 liyofilize tavşan serumundan (Behring) yararlanıldı. Liyofilize serum distile suda çözüldükten sonra küçük miktarlarda -50°C 'de donduruldu, kullanılacağı zaman PBS (fosfat tampon solusyonu : 8.5 g NaCl, 8.63 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.48 g KH_2PO_4 /lt pH:7.2) ile 1:10 oranında sulandırıldı. Diğer serumlar da daha önce formülü verilen BSS ile 1:10 oranında sulandırılıp kullanıldı. Pozitif ve negatif serumlara inaktivasyon yapılmadı. Bir aydan fazla donmuş halde saklanan FITC bağlı anti-C3 serumları sulandırıldıktan sonra 1000 RPM 'de 5 dakika santrifüj edilerek kullanıldılar.

ANTI - KOMPLEMAN İMMÜNFLORESANS TEKNİĞİ

Anti - kompleman immünfloresans ile EBV çekirdek antijenlerinin (EBNA) gösterilmesi için her testte pozitif kontrol hücre preparatlarından, negatif kontrol hücre preparatlarından ve lenf nodu biyopsi hücre preparatlarından üçer preparat çalışmaya alındı. Bütün gruplarda pozitif serum, negatif serum ve BSS (dengeli tuz solusyonu) boyanmalarına bakıldı. Preparatlara serumlar, aşağıdaki sıra izlenerek uygulandı:

Pozitif hücre preparatları (RAJi hücreleri) üzerine:

- 1) Pozitif serum + Negatif serum (kompleman) + FITC - anti kompleman serum
- 2) Negatif serum + Negatif serum (kompleman) + FITC - anti kompleman serum
- 3) BSS + Negatif serum (kompleman) + FITC - anti kompleman serum

Negatif hücre preparatları (RAMOS hücreleri) üzerine:

- 1) Pozitif serum + Negatif serum (kompleman) + FITC - anti kompleman serum

- 2) Negatif serum + Negatif serum (kompleman) + FITC - anti kompleman serum
- 3) BSS + Negatif serum (kompleman) + FITC - anti kompleman serum

Lenf nodu biyopsi preparatları üzerine:

- 1) Pozitif serum + Negatif serum (kompleman) + FITC - anti kompleman serum
- 2) Negatif serum + Negatif serum (kompleman) + FITC - anti kompleman serum
- 3) BSS + Negatif serum (kompleman) + FITC - anti kompleman serum

EBNA BOYANMASI İŞLEMLERİ

- 1) İçinde pH 6.9 olan BSS (dengeli tuz solusyonu) bulunan bir beherin (1 lt) iç ceperine tutturulan preparatlar 10 dakika magnetik karıştırıcı yardımı ile yıkandı.
- 2) Preparatlardaki fazla BSS 'ler kurutma kağıdı ile alındı. Hücreler kurumadan ilk serumlar ilave edildi (pozitif serumlar, negatif serumlar, BSS). Her preparata ince uçlu pastör pipeti ile iki damla serum ilave edildi. Pipetin düzgün ucu ile serumlar, lam yüzeyinde hücrelerin üzerine yayıldı.
- 3) Preparatlar 37⁰C 'de bir saat nemli kutuda inkübasyona bırakıldı.
- 4) Preparatlar üç kez BSS ile ilk yıkamada olduğu gibi 30 dakika boyunca yıkandılar. Her 10 dakikada bir BSS değiştirildi.
- 5) Kompleman ilavesi: BSS fazlası alınan preparatlara ince uçlu pastör pipeti ile ikişer damla negatif serum damlatıldı. Serumlar, pipetin düzgün ucu ile lam yüzeyine yayıldı.
- 6) Kompleman inkübasyonu: İki ayrı süre denendi.
 - a) Nemli kutuda, 4⁰C 'de bir gece inkübasyon.
 - b) Nemli kutuda, 37⁰C 'de bir saat inkübasyon.

- 7) Önceki yıkamalarda olduğu gibi üç kez BSS ile bütün preparatlar yıkandı.
- 8) FITC bağlı anti - kompleman immün serum ilavesi: BSS fazlası alınan preparatlara pastör pipeti ile ikişer damla FITC bağlı anti - kompleman serum ilave edildi. Serum yine düzgün bir şekilde yayıldı.
- 9) Nemli kutuda 37°C 'de bir saat inkübasyona bırakıldı.
- 10) BSS ile üç kez aynı şekilde yıkama yapıldı.
- 11) Distile su ile 10 dakika yıkama yapıldı.
- 12) Evans mavisi ile boyama: Konsantrasyonu 100mg/lt olan Evans mavisi ile bütün preparatlar 5 dakika boyandı.
- 13) Son kez bütün preparatlar üç defa BSS ile yıkandı.
- 14) Preparatlar kurulandı ve üzerlerine 1:1 oranında BSS:gliserol (pH:7) damlatılıp lamel kapatıldı. Lamellerin kenarı oje ile kaplandı.
- 15) Buzdolabında (4°C) bekletilen preparatlar, transmitted light floresan mikroskopunda (Olympus, Japan) ve epi - floresan mikroskopunda (Carl Zeiss, W. Germany), immersiyon yağı ile 40X ve 100X büyütmelede incelendi, fotoğrafları çekildi.

BULGULAR

Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi Onkoloji Bölümü ve Hacettepe Hastanesi Dahiliye Bölümü'nün 20/1/1984 ve 15/2/1985 tarihleri arasında lenf nodu biyopsisi yapılan hastalarının taze biyopsi materyalleri kullanılarak hazırlanan ve saklanan preparatları ACIF (anti - kompleman immünfloresans) tekniği ile EBNA (Epstein - Barr çekirdek antijenleri) yönünden incelenmişlerdir. İncelenen 19 vakadan dördü EBNA pozitif olarak değerlendirilmiştir (Tablo 1). Pozitif olarak değerlendirilen vakalardan birisi (vaka 3) Pediatrik Onkoloji Bölümü'nün pleomorfik adenomalı bir hastasıdır. İkinci bir pozitif vaka (vaka 13) Dahiliye Bölümü tarafından Burkitt lenfoması olarak izlenen bir hastasıdır. Üçüncü pozitif vaka (vaka 14) Pediatrik Onkoloji Bölümü'nün nazofarengeal karsinomalı ve lenfoepitelioma metastazı bulunan bir hastasıdır. Dördüncü pozitif vaka (vaka 15) yine Pediatrik Onkoloji Bölümü'nün Burkitt lenfoması tanısı koyduğu ve takibe aldığı bir hastasıdır. Diğer 15 vaka EBNA negatif olarak değerlendirilmiştir. Bunlardan Pediatrik Onkoloji Bölümü'nün Burkitt lenfoma tanısı ile takibe aldığı bir vaka da (vaka 7) negatiftir. Negatif vakalardan diğer beş tanesi Hodgkin lenfomalı, beş tanesi de çeşitli tipte lenfoması olan hastalardır. Negatif olarak değerlendirilen dört vakadan da üçü reaktif folliküler hiperplazili, biri de tüberküloz lenfadenopatili bir hastadır. Her vaka, kontrol olarak kullanılan ve EBNA pozitif reaksiyon veren Raji hücreleri ve EBNA negatif reaksiyon veren Ramos hücreleri ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrollerde, hücrenin çekirdek bölgesinde oldukça parlak, kum tanecikleri görüntüsü veren yeşil floresans görülmektedir. Hücre sitoplazması Evans mavisinin UV ışığında metakromazi göstermesi sonucu

kırmızı olarak izlenmiştir (Fotoğraf 1-4). Negatif kontrollerde, hücrenin çekirdekleri daha koyu olmak üzere bütün hücreler Evans mavisi nedeni ile kırmızı renkte görülmektedirler. Bu preparatlarda hiç floresans boyanmaya rastlanmamaktadır (Fotoğraf 5-8). Kontrol pozitif preparatlarda, fikşasyon sırasında ölen ve çekirdek yapısı bozulan hücreler literatürde de belirtildiği gibi floresan boya almamaktadırlar (Fotoğraf 2).

VAKA 1 : M. Ç., 1497241 protokol numaralı, 17 yaşında bayan hasta Tüberküloz (TB) lenfadenit granümatöz iltihap tanısı almıştır. Sağ, submandibular lenf nodu çıkarılan hastanın biyopsi hücreleri, EBNA yönünden negatiftir.

VAKA 2 : K. T., 1600225 protokol numaralı, 3 yaşında erkek hasta, non - Hodgkin lenfoma tanısı almıştır. Laparotomi materyalinde ACIF testi uygulanmış ve EBNA yönünden negatif olarak değerlendirilmiştir.

VAKA 3 : Y. D., 1604716 protokol numaralı, 16 yaşında bayan hasta mikst sellüler tip pleomorfik adenoma tanısı almıştır. Sol submandibular bölgeden biyopsi yapılmıştır. ACIF testi sonunda hücrelerde parlak floresans gözlenmiştir (Fotoğraf 9-10).

VAKA 4 : G. D., 1604485 protokol numaralı, 4 yaşında bayan hasta lenfadenopati tanısı almıştır. Reaktif folliküler hiperplazi olarak değerlendirilen bu vakada sol servikal lenf nodu hücreleri EBNA yönünden negatiftir.

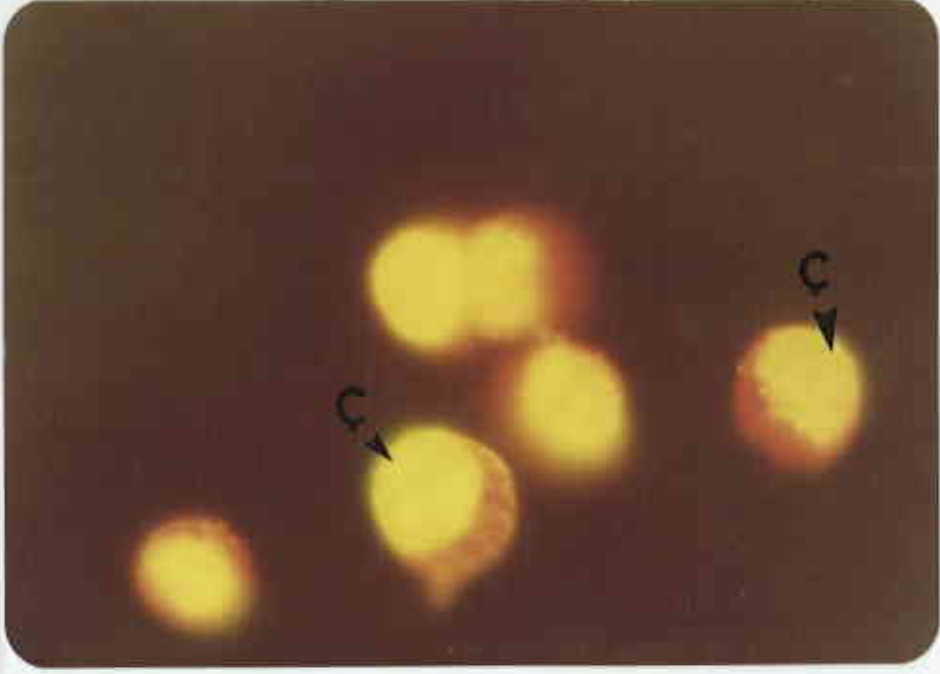
VAKA 5 : H. E., 1404405 protokol numaralı, 17 yaşında erkek hasta lenfositten yoksun, histiyositten zengin Hodgkin lenfoma tanısı almıştır. Sol aksiller lenf nodu hücrelerinde ACIF testi sonunda EBNA negatif reaksiyon saptanmıştır.



Fotoğraf 1 : Raji hücreleri, EBV-pozitif serum, kompleman, FITC-antiC3 ve Evans mavisi ile ışık mikroskobu görüntüsü. Ç, Çekirdek. Objektif büyütmesi 100X.



Fotoğraf 2 : Raji hücrelerinde pozitif reaksiyon, EBV-pozitif serum, kompleman, FITC-antiC3 ve Evans mavisi ile floresan mikroskobu görüntüsü. Ç, yeşil floresan boyanmış çekirdekler. Objektif büyütmesi 100X.



Fotoğraf 3 : Raji hücrelerinde pozitif reaksiyon, EBV-pozitif serum, kompleman, FITC-antiC3 ve Evans mavisi ile floresan mikroskobu görüntüsü. Ç, Çekirdek. Objektif büyütmesi 100X.



Fotoğraf 4 : Raji hücrelerinde pozitif reaksiyon, EBV-pozitif serum, kompleman, FITC-antiC3 ve Evans mavisi ile floresan mikroskobu görüntüsü. Objektif büyütmesi 40X.



Fotoğraf 5 : Ramos hücreleri, EBV-pozitif serum, kompleman, FITC-antiC3 ve Evans mavisi ile ışık mikroskobu görüntüsü. Ç, Çekirdek. Objektif büyütmesi 100X.



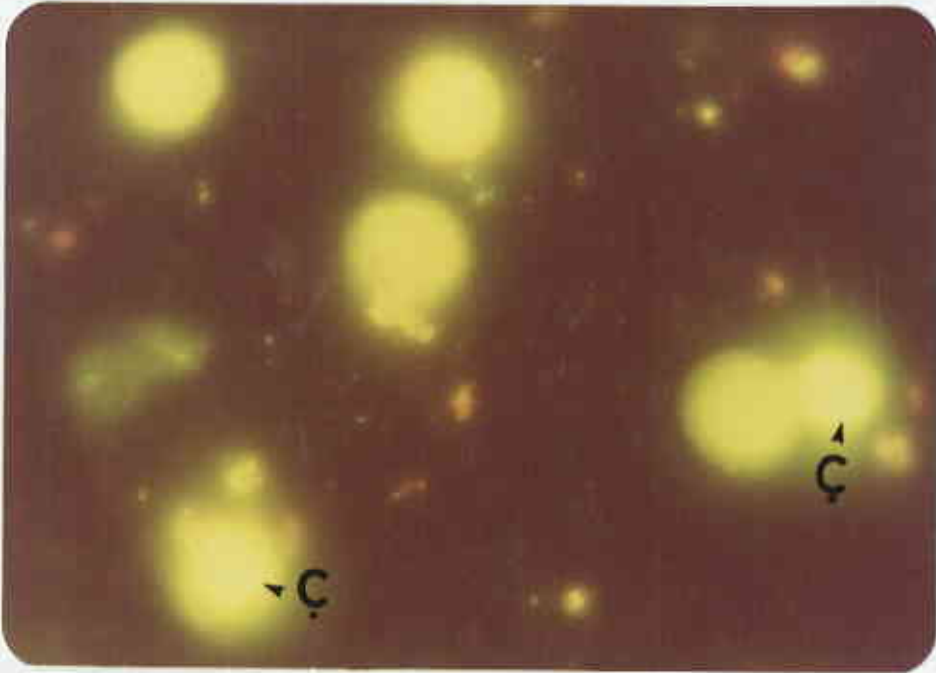
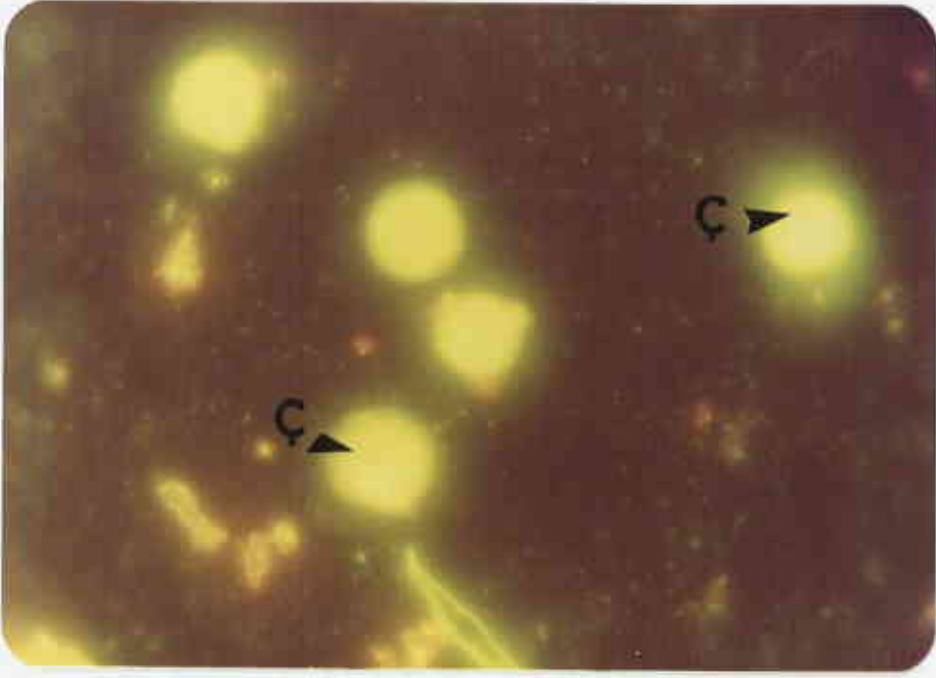
Fotoğraf 6 : Ramos hücrelerinde negatif reaksiyon, EBV-pozitif serum, kompleman, FITC-antiC3 ve Evans mavisi ile floresan mikroskobu görüntüsü. Objektif büyütmesi 100X.



Fotoğraf 7 : Raji hücrelerinde negatif reaksiyon, EBV-negatif serum, kompleman, FITC-antiC3 ve Evans mavisi ile floresan mikroskobu görüntüsü. Objektif büyütmesi 100X.



Fotoğraf 8 : Ramos hücrelerinde negatif reaksiyon, EBV-pozitif serum, kompleman, FITC-antiC3 ve Evans mavisi ile floresan mikroskobu görüntüsü. Objektif büyütmesi 40X.



Fotoğraf 9, 10 : Pleomorfik adenoma biyopsi hücrelerinde (vaka 3) pozitif reaksiyon, EBV-pozitif serum, kompleman, FITC-antiC3 ve Evans mavisi ile floresan mikroskopu görüntüsü. Objektif büyütmesi 100X.

VAKA 6 : M. A., 1066926 protokol numaralı, 5 yaşında erkek hasta Hodgkin lenfoma (mikst sellüler tip) tanısı almıştır. Biyopsi sol servikal bölgeden yapılmıştır. Bu biyopsi hücreleri EBNA yönünden negatif olarak değerlendirilmiştir.

VAKA 7 : E. A., 1614498 protokol numaralı, 14 yaşında bayan hasta Burkitt lenfoması tanısı almıştır. Karın sıvısı hücrelerinde yapılan ACIF testi negatif sonuç vermiştir.

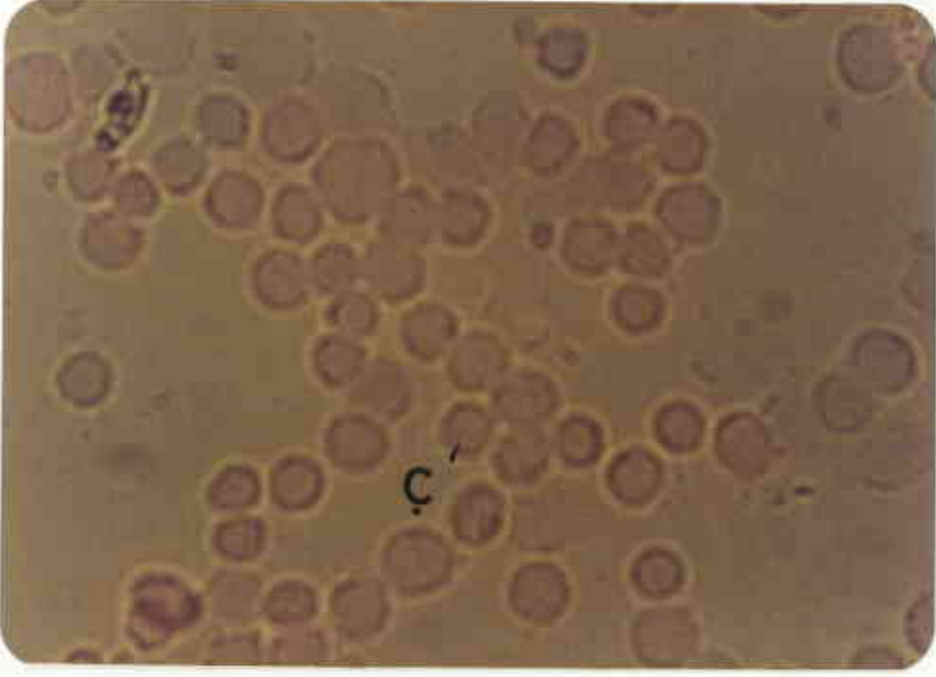
VAKA 8 : S. F., 1623512 protokol numaralı, 5 yaşında bayan hasta Hodgkin lenfoma tanısı almıştır. Sol servikal bölgeden, çevre yumuşak dokusu ve lenf nodu biyopsisi yapılmıştır. Bu hücreler EBNA yönünden negatif olarak değerlendirilmiştir.

VAKA 9 : K. B., 1629373 protokol numaralı, 5 yaşında erkek hasta lenfoblastik lenfoma tanısı almıştır. Sol aksillar lenf nodu biyopsi hücrelerinde ACIF testi, EBNA yönünden negatif olarak değerlendirilmiştir.

VAKA 10 : G. O., 1627225 protokol numaralı, 4 yaşında bayan hastada yuvarlak hücreli malign tümör gelişmiştir. Boyundan alınan kitle materyalinde ACIF testi sonunda EBNA yönünden negatif değerlendirme yapılmıştır.

VAKA 11 : F. Y., 1631051 protokol numaralı, 4 yaşında bayan hasta lenfosit azlığı ile giden Hodgkin lenfoma tanısı almıştır. Sağ servikal lenf nodu hücreleri ile çalışılmıştır. EBNA yönünden negatif olarak değerlendirilen bir vakadır.

VAKA 12 : E. Ç., 1630816 protokol numaralı, 15 yaşında erkek hasta reaktif folliküler hiperplazi tanısı almıştır. Sol servikal lenf nodu



Fotoğraf 11 : Reaktif lenf nodu biyopsisi hücreleri (vaka 12), EBV-pozitif serum, kompleman, FITC-antiC3 ve Evans mavisi ile ışık mikroskobu görüntüsü. Ç, Çekirdek. Objektif büyütmesi 40X.



Fotoğraf 12 : Reaktif lenf nodu biyopsisi hücrelerinde (vaka 12), negatif reaksiyon, EBV-pozitif serum, kompleman, FITC-antiC3 ve Evans mavisi ile floresan mikroskobu görüntüsü. Objektif büyütmesi 40X.



Fotoğraf 13, 14 : Burkitt lenfoması biyopsi hücrelerinde (vaka 13) zayıf pozitif floresans. EBV-pozitif serum, kompleman, FITC-antiC3 ve Evans mavisi ile floresan mikroskobu görüntüsü. Ç, Çekirdek. Objektif büyütmesi 100X.

epitelioma metastazı biyopsi hücrelerinde EBNA negatif reaksiyon alınmıştır.

VAKA 18 : F. Sa., 1649368 protokol numaralı, 15 yaşında bayan hastaya yapılan biyopsi sonucu, sağ boyun lenf nodlarına, reaktif lenf nodu tanısı verilmiştir. EBNA yönünden negatiftir.

VAKA 19 : A. O. A., 1628568 protokol numaralı, 17 yaşında erkek hastada diffüz, az diferansiye, lenfositler tip malign lenfoma görülmüştür. EBNA yönünden negatif olarak değerlendirilen bir vakadır.

Tablo - 1 : Çalışılan bütün vakalara ait bilgiler ve EBNA sonuçları

No	Adı - Soyadı	Cinsiyeti	Yaşı	Protokol No.	Biyopsi Tarihi	Patolojik Tanı	Canlılık %	EBNA
1	M. Ç.	K	17	1497241	20/1 /1984	Tüberküloz / lenfadenit	-	-
2	K. T.	E	4,5	1600225	24/1 /1984	Non-Hodgkin lenfoma	-	-
3	Y. D.	K	15	1604716	17/2 /1984	Pleomorfik adenoma	40	++
4	G. D.	E	4	1604485	20/2 /1984	Reaktif folliküler hiperplazi	70	-
5	H. E.	E	20	1404405	12/3 /1984	Hodgkin lenfoma	50	-
6	M. A.	E	5	1066926	19/3 /1984	Hodgkin lenfoma	21	-
7	E. A.	K	14	1614498	30/5 /1984	Burkitt lenfoması	50	-
8	S. F.	K	5	1623512	9/8 /1984	Hodgkin lenfoma	76	-
9	K. B.	E	5	1629373	18/9 /1984	Lenfoblastik lenfoma	90	-
10	G. O.	K	4	1627225	20/9 /1984	İnfiltratif malign tümör	50	-
11	F. Y.	K	4	1631051	28/9 /1984	Hodgkin lenfoma	50	-
12	E. Ç.	E	15	1630816	1/10/1984	Reaktif folliküler hiperplazi	90	-
13	M. K.	E	41	1714999	2/11/1984	Burkitt lenfoması	30	+
14	E. H.	E	14	1639257	26/11/1984	Nazofarengeal karsinoma	100	+
15	S. D.	E	3	1647063	13/1 /1985	Burkitt lenfoması	90	+
16	A. S.	E	17	864514	21/1 /1985	Hodgkin lenfoma	60	-
17	F. Sert.	K	15	1649368	5/2 /1985	Reaktif folliküler hiperplazi	80	-
18	F. Sa.	K	13	1650008	8/2 /1985	Lenfoepitelioma metastazı	75	-
19	A. O. A.	E	17	1628568	15/2 /1985	Malign lenfoma	99	-

++ Kuvvetli floresans, + Zayıf floresans, + Pozitif reaksiyon, - Hiç boyanma yok

TARTIŞMA

ACIF (anti - kompleman immünfloresans) tekniği, ilk kez Reedman ve Klein⁹⁷ tarafından Raji hücrelerinden yararlanılarak çeşitli lenfomalı hastalardaki EBV antikör düzeylerini saptamak için uygulanmıştır. Bu uygulama diğer indirekt floresans metodlarından farklı olarak, kompleman ilavesi ile etkisi arttırılan bir floresans yöntemidir⁹⁷. Bu hassasiyet nedeni ile de daha önce tesbit edilmiş olan ve özellikle üretken olmayan lenfoblastoid hücrelerde bulunan çekirdek antijenlerinin (EBNA) saptanması mümkün olmuştur. Çekirdek antijenlerin saptanması ile EBV 'nun, gizli enfeksiyon yaptığı hücrelerde de gösterilmesi sağlanmıştır. EBNA, EBV genomu bulunduran her hücre türünde mevcut olan bir antijendir. Bu nedenle EBNA 'nin gösterilmesi viral genomun varlığına kanıt teşkil etmektedir. Viral genomun varlığını göstermenin ACIF tekniğinin dışında bugün pratikte uygulanır hale getirilen başka teknikleri de vardır. Nükleik asit hibridizasyon metodları bu amaçla uygulanan en hassas yöntemlerdir⁴³⁻⁴⁵. Bugün uygulanabilirliği gösterilmiş, AMDI ve AFNB tekniklerinden söz edilmektedir. AFNB (acid fixed nuclear binding) tekniğinde biyopsi materyalinden hazırlanan özütler kullanılmakta ve EBNA 'nin DNA bağlı kolonlarda görülmesi sağlanmaktadır¹⁵⁹. AMDI (amplified direct immünflorescence) testinde ACIF testinden farklı olarak insan serumları dışında, anti - insan tavşan serumları ile daha etkili floresan boyanma özelliği rapor edilmiştir¹⁷².

ACIF tekniği ise amacına uygun olarak pratikte uygulanması daha kolay bir yöntemdir. Fazla vakit almamaktadır. Fakat bazen uygulama sırasında meydana

gelecek güçlükleri önlemek her zaman mümkün olmamaktadır. Bu güçlükler özellikle hücrelerin hazırlanması sırasında ortaya çıkan güçlüklerdir. Bu sebeple testten teste, hatta her testte hücreden hücreye EBNA boyanması açısından farklılıklar olmaktadır⁹⁷. Hücrelerin hazırlanması dönemlerinden ilki yaymaların kuruma devresidir. Bu kademedeki en az yarım saat kuruma süresinin verilmesi gerekmektedir^{158,173}. Çekirdek içindeki antijenin dışarı kaçması için bu devre çok uygundur. Hücrelerin bozulmadan kurumaları sağlanmalıdır. Çalışmamızda preparatların oda sıcaklığında yarım saat veya daha fazla bir süre içinde kendiliğinden kuruması sağlanmıştır. Fiksasyon sırasında da hücrelerin bozulması EBNA 'nin etkinliğinin azalması sonucunu doğurmaktadır. Testte fiksasyon materyali olan aseton:metil alkol (2:1) karışımı bu amaçla en uygunu olarak seçilmiştir. Hazırlanmış preparatların EBNA 'nin bozulmadan saklanabilmesi için en az -20°C 'de bekletilmeleri gerekmektedir. Preparatların -70°C 'de boyama yapılmaya kadar aylarca saklanmaları mümkündür. Bu çalışmada da hücrelerin 4 - 6 ay -50°C 'de saklı kalmaları EBNA reaksiyonlarını etkilememiştir. Bu durum kontrol hücreleri için de aynı şekilde uygulanmış ve her doku, aynı zamanda fikse edilen kontrol preparatlarındaki EBNA pozisyonuna göre değerlendirilmiştir. Çalışma materyalinin biyopsi hücreleri olması bir diğer güçlüğü doğurmaktadır. Hücrelerin canlılığı bu aşamada önemlidir. Canlılığını kaybetmiş ya da canlılık oranı azalmış hücrelerde yapılan fiksasyonlarda EBNA gösterilememektedir ve EBNA pozitif hücre oranı düşmektedir^{97,158}. Bu nedenle hücrelerin canlılığını son fiksasyon kademesine kadar takip etmek gerekmiştir. Gerek görüldüğünde ve hücre sayısı yeterli olduğunda Ficoll - Hypaque gradienti uygulanarak fikse edilecek hücreler ölü hücrelerden ayrılmaya çalışılmıştır. Canlılığın son fiksasyon

kademesinde % 50 'nin altına düşmemesine dikkat edilmiştir. Biyopsi materyallerinde bir diğer güçlük de heterojen hücre populasyonları ile çalışma zorunluluğudur. Dokulardan ayrılan çeşitli tipte hücreler içinde EBNA pozitif olabilecek hücrelerin oranını saptamak mümkün olmamıştır. Dokudan ayrılan hücre miktarı bu konuda sınırlama getirmekte ve heterojenliğin önüne geçilememektedir. Yine her hücrede mevcut genom sayısına bağlı olarak da dokudan dokuya floresansın parlaklığı yönünden farklar meydana gelmektedir^{97,158,173}.

Tekniğin uygulanışı sırasında kullanılan serumların tazeliği de pozitif reaksiyonlar için önem taşımaktadır. Özellikle kompleman serumunun ve floresan antikonlarının taze kullanılması gerekmektedir. Sulandırılmış serumları tekrar kullanmak başarısız olmaktadır. Çalışmamızda kompleman inkübasyonu için iki ayrı süre denenmiş, bir gece 4°C 'de inkübasyon uygulaması, daha iyi kompleman birleşmesi için uygun görülmüş ise de 37°C 'de bir saatlik uygulama ile aralarında fark bulunmamıştır. Pozitif serumlarda EBNA antikor düzeyinin yüksek olması gerekmemektedir. EBNA antikor düzeyi 1/40-1/80 olan serumlar çalışma için uygundur. ACIF testi sırasında kontroller, non-spesifik bağlanma olup olmadığını anlamak için her preparatta ayrı boyamalarla incelenmişlerdir. Kontrol hücre gruplarının pozitif, negatif, BSS ile floresan boyanmalarına bakılmış, ayrıca vaka hücrelerine de pozitif serum dışında negatif serum ile floresan boyama yapılarak, non-spesifik reaksiyon olup olmadığı kontrol edilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan hasta materyalleri tekniğe uygun olarak fikse edilmişler ve EBNA sonuçları daha sonra patoloji sonuçları ile karşılaştırıl-

mıŖlardır. İlk iki vaka hariç, bütün biyopsi hücrelerinde canlılık kontrolleri yapılmıŖtır. Canlılık yüzdeleri Tablo - 1 'deki gibidir. Değerlendirme sonuçları literatüre uygunluk göstermektedir. Pozitif olarak kabul ettiğimiz bir BL vakasında (vaka 13) EBNA yönünden yapılan değerlendirmede güçlük çekilmiŖtir. Bu vakada fiksasyon öncesinde hücreler +4⁰C 'de bir gece beklemiŖlerdir. Bu durum canlılığın % 30 'a düşmesine neden olmuŖtur. Vakanın negatif kontrolleri ile pozitif boyama yapılan preparatları arasında görölen fark nedeni ile pozitif değerlendirme yapılmıŖtır. Hem canlılık yüzdesinin düşük olması hem de hücrelerde bulunan genom miktarına bağlı olarak zayıf bir pozitif reaksiyon izlendiği düşünölmektedir (Fotoğraf 13-14). Pozitif reaksiyon alınan ikinci Burkitt lenfoması (vaka 15) bir çocuk hastadır. Kemik iliği tutulumu baŖladığı için bu hücrelerden çalışma yapılmıŖ ve pozitif reaksiyon gösteren hücreler saptanmıŖtır. Hücrelerin kümeleŖme yaptıkları preparatlarda negatif kontrollerde görölmeyen, pozitif reaksiyon veren hücreler saptanmıŖtır (Fotoğraf 17-18). Negatif sonuç alınan bir diğer BL 'lı hastada da (vaka 7) karın sıvısı hücreleri fiksasyon için temin edilebilmiŖtir. Histopaque gradienti de yapılan bu hücreler içinde EBNA pozitif hücreye rastlanmamıŖtır. Bu duruma heterojen hücre popülasyonu ile çalışmanın neden olduğu düşünölmektedir. Burkitt lenfoması en çok Doğu Afrika 'da ve Yeni Gine 'de (New Guinea) görölen bir lenfoma türüdür. Bu bölgede rastlanan vakalar % 90 'ın üzerinde EBV ile ilgili olarak çekirdek antijenleri bulundurmaktadırlar⁹⁰. Yeni Gine 'de ve Batı Afrika 'da endemik bölge dışında histolojik olarak BL tanısı alan sporadik BL vakalarına rastlanmaktadır¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. Bu vakaların EBV ile olan ilgileri farklılıklar göstermektedir. Afrika formlarının dışında Amerika 'da ve diğer bölgelerde görölen Burkitt lenfoması

vakalarında EBV ile ilgili bulunanlar % 10 kadardır^{14,176}. Bu durumda BL vakalarını EBV ile ilgili bulunanlar ve EBV ile ilgisi olmayan BL 'lar olarak incelemek gerekmektedir. Çalışmamızda yer alan ve pozitif olarak değerlendirdiğimiz BL vakalarının bu açıdan önemli oldukları düşünülmektedir.

Nazofarengeal karsinoma ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda da bu hastalığın EBV ile olan ilgisi, dünyanın çeşitli bölgelerinden bildirilen, hem seroepidemiolojik olarak hem de EBV genomunun varlığı yönünden pozitif vakalar ile gösterilmektedir¹⁷⁷. Literatüre uygun olarak bizim çalışmamızda da nazofarengeal karsinomalı bir hastanın (vaka 14) lenfoepitelioma metastazına ait hücrelerde de EBNA pozitif reaksiyon saptanmıştır. Metastaz yapan hücrelerin karakterine bağlı olarak bu biyopsi hücrelerinde EBNA pozitif reaksiyon gözlenmiştir (Fotoğraf 15-16).

EBNA pozitif olarak değerlendirilen ve literatürde de az rastlanan bir durum, pleomorfik adenoma vakasında gözlenmiştir (vaka 3). Bu konuda A. K. Saemundsen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma tek örnek olarak saptanmıştır¹²⁶. Grönland Eskimolar 'ı arasında tükürük bezi tümörleri yüksek sıklıkla görülmektedir. Üç hastada yapılan nükleik asit hibridizasyon çalışması sırasında bir vakada genom varlığı bildirilmiştir¹²⁶. Normal girişi ve primer enfeksiyon yaptığı yer orofarenks olan EBV 'nun, normal tükürük bezlerinde ve özellikle parotis tükürük bezinde yerleşmesi ve çoğalması mümkün görülmektedir. Bu dokuların malign tümörlerinde de EBV genomunun ve EBNA 'lerin bulunması, etiyolojik ajan olarak tükürük bezi tümörlerinde de EBV 'nun rolü olduğunu düşündürmektedir. Bu çalışmada da patoloji sonucu pleomorfik adenoma olarak bildirilen vakamızda, hücre-

Terde kuvvetle EBNA pozitif reaksiyon alınmıştır (Fotoğraf 9-10).

Negatif sonuç alınan vakaların Hodgkin lenfoma tanısı ile değerlendirilenlerinde, biyopsi hücrelerinde EBNA 'lerin görülmemesi yapılan başka çalışmalarla da uygunluk göstermektedir. Hodgkin lenfomada hastalarda EBV 'ne karşı immün cevap gelişmekle beraber tümör hücrelerinde genom varlığına rastlanmamaktadır^{90,121-124}. Diğer negatif bulgu veren vakalar da EBV ile ilgili olmayan tümörler olarak değerlendirilmişlerdir. Lenfadenoma grubu reaktif hiperplaziler de EBV genomunun bulunmaması ile testin doğruluğu açısından kontrol vakalar olarak çalışma protokolüne dahil edilmişlerdir.

Bu değerlendirmelere göre, çalışmamızda uyguladığımız ACIF tekniğinin, ülkemiz şartlarında çeşitli lenfoma ve lenfoproliferatif hastalıklarda EBV 'nun etiyolojik açıdan durumu konusunda ileride yapılacak çalışmalarda yararlı bilgiler verecek nitelikte olduğu görüşüne varılmıştır.

ÖZET

Çalışmamızda, Hacettepe Hastanesi Dahiliye Bölümü ve Hacettepe Çocuk Hastanesi Onkoloji Bölümü 'nün lenf nodu biyopsisi yapılan 19 hastasına ait taze biyopsi materyallerinde ACIF (anti-kompleman immünfloresans) tekniği ile EBNA (Epstein-Barr çekirdek antijenleri) araştırılmıştır. Kontrol olarak EBNA pozitif, üretken olmayan Raji hücre dizisi ve EBNA negatif Ramos hücre dizisi kullanılmıştır.

Vakalarımızdan dördü EBNA pozitif olarak değerlendirilmiştir. Bunlardan iki tanesi BL tanısı alan hastalardır. Diğer iki vakanın birisi lenfoepitelioma metastazı olan bir NPC (nazofarengeal karsinoma) hastası, diğeri de Pleomorfik adenoma tanısı alan bir hastadır. Negatif olarak değerlendirilen vakaların beşi Hodgkin lenfomalı, beşi de çeşitli tipte lenfomalı hastalardır. Üç reaktif folliküler hiperplazi, bir tüberküloz lenfadenopati ve bir de BL (Burkitt lenfoması) hastası negatif olarak değerlendirilen diğer vakaları oluşturmaktadır.

Bu değerlendirmelere göre ülkemizde EBV (Epstein-Barr virusu) 'nun lenfoma etiolojisindeki yeri konusunda yapılacak çalışmalarda ACIF tekniğinden yararlanılmasının uygun olduğu görüşüne varılmıştır.

Düzelme

Kaynak 1: Dulbecco R. Oncogenic Viruses. In: Davis
BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS. Microbiology
Third Edition. Harper and Row, Publishers, Inc. 1980:
1231-1261

15. Tevethia SS. Immunfluorescence staining of DNA tumor virus-induced antigens. 1975. *Ann NY Acad Sci* 254: 541-551.
16. Levine AJ. Transformation-associated tumor antigens. 1982. *Adv Cancer Res* 27: 75-104.
17. Damjanov I, Knowles BB. Biology of disease monoclonal antibodies and tumor-associated antigens. 1983. *Lab Invest* 48: 510-525.
18. Roger GT. Carcinoembryonic antigens and related glycoproteins molecular aspects and specificity. 1983. *Biochim Biophys Acta* 695: 227-249.
19. Hinuma Y, Konn M, Yamaguchi J, Wudarski JD, Blakeslee JR, Grace JT. Immunfluorescence and Herpes-type virus particles in the P3HR-1 Burkitt lymphoma cell line. 1967. *J Virol* 1: 1045-1051.
20. Miller G, Shope T, Liscò H, Stitt D, Lipman M. Epstein-Barr Virus: Transformation, cytopathic changes and viral antigens in squirrel monkey and marmoset leukocytes. 1972. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 383-387.
21. Epstein MA, Barr YM. Cultivation in vitro of human lymphoblasts from Burkitt's malignant lymphoma. 1964. *Lancet* 1: 252-253.
22. Luka J, Kallin B, Klein G. Induction of the Epstein-Barr virus (EBV) cycle in latently infected cells by n-butyrate. 1979. *Virology* 94: 228-231.
23. Feighny RJ, Farrell MP, Pagano JS. Polypeptide synthesis and phosphorylation in Epstein-Barr virus-infected cells. 1980. *J Virol* 34: 455-463.
24. Bayliss GJ, Wolf H. The regulated expression of EBV. III. Proteins specified by EBV during the lytic cycle. 1981. *J Gen Virol* 56: 105-118.
25. Kawanishi G, Sugawara K, Ito Y. Epstein-Barr Virus-induced polypeptides: A comparative study with superinfected Raji, IUdR-treated, and N-Butyrate-treated P3HR-1 cells. 1981. *Virology* 109: 72-81.
26. Pulvertaft RJV. A study of malignant tumors in Nigeria by short term tissue culture. 1965. *J Clin Pathol* 18: 261-271.
27. Toplin I. Partial purification and electron microscopy of virus in the EB-3 cell line derived from a Burkitt lymphoma. 1966. *Science* 152: 1084-1085.
28. Henle W. The Epstein-Barr Virus. 1979. *Sci Am* 241: 48-59.
29. Epstein MA, Henle G, Achong BG, Barr YM. Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. 1965. *J Exp Med* 121: 761-769.

KAYNAKLAR

1. Davis BD, et al. Oncogenic viruses. In: Microbiology. Harpes and Row publishers Inc, 1980: 1232-1260.
2. Pimentel E. Human oncovirology. 1979. Biochim Biophys Acta 560:169-216.
3. Allen DW, Cole P. Viruses and human cancer. 1972. N Engl J Med 286:70-82.
4. Zur Hausen H, Gissman L. Papilloma viruses. In: Klein G, Viral oncology. New York: Raven Press, 1980:433-445.
5. Howley PM. Molecular biology of SV40 and the human Polyomaviruses BK and JC. In: Klein G, Viral oncology. New York: Raven Press, 1980: 489-550.
6. Flint SJ. Molecular biology of Adenoviruses. In: Klein G. Viral oncology. New York: Raven Press, 1980:603-663.
7. Nazerian K. Marek's disease: A Herpesvirus-induced malignant lymphoma of the chicken. In: Viral oncology, New York: Raven Press, 1980:665-682.
8. Calnek BW. Marek's disease virus and lymphoma. In: Rapp F, Oncogenic Herpesviruses volume I. Florida: CRC Press, 1980: 103-143.
9. Naegele RF, Granoff A. The Lucké tumor and its Herpesvirus. In: Rapp F, Oncogenic Herpesviruses volume I. Florida: CRC Press, 1980: 86-100.
10. Falk LA, Jr. Simian Herpes viruses and their oncogenic properties. In: Rapp F, Oncogenic Herpesviruses volume I. Florida: CRC Press 1980: 146-168.
11. Falk AL, Jr. Biology of Herpesvirus saimiri and Herpesvirus ateles. In: Klein G, Viral oncology. New York: Raven Press 1980: 813-832.
12. Geder L. Oncogenic properties of human cytomegalovirus. In: Rapp F, Oncogenic Herpesviruses volume II. Florida: CRC Press 1980: 48-57.
13. Nahmias AJ, Norrild B. Oncogenic potential of Herpes simplex viruses and their association with cervical neoplasia. In: Rapp F, Oncogenic Herpesviruses volume II. Florida: CRC Press, 1980: 26-40.
14. Zur Hausen H. Oncogenic Herpes viruses. 1975. Biochim Biophys Acta 417: 25-53.

30. Epstein MA. Aspects of the EB virus. 1979. *Adv Cancer Res* 13: 383-411.
31. Epstein MA, Achong BG. The Epstein-Barr virus. 1973. *Annu Rev Microbiol* 27: 413-436.
32. Weinberg A, Becker Y. Studies on EB virus of Burkitt's lymphoblasts. 1969. *Virology* 39: 312-321.
33. Dolyniuk M, Pritchett R, Kieff E. Proteins of Epstein-Barr virus I. 1976. *J Virol* 17: 935-949.
34. Dolyniuk M, Wolff E, Kieff E. Proteins of Epstein-Barr virus II. 1976. *J Virol* 18: 289-297.
35. Kieff E, Given D, Thomas Powell AL, King W, Dambaugh T, Raab-Traub N. Epstein-Barr virus: Structure of the viral DNA and analysis of viral RNA in infected cells. 1979. *Biochim Biophys Acta* 560: 355-373.
36. Baer R, Bankier AT, Biggin MD, Deininger PL, Farrell JP, Gibson TJ, Hatfull G, Hudson GS, Satchwell SC, Seguin C, Tuffnell PS, Barrel BG. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. 1984. *Nature* 310: 207-211.
37. Kintner CR, Sugden B. The structure of the termini of the DNA of Epstein-Barr virus. 1979. *Cell* 17: 661-671.
38. Hyman RW. Comparison of Herpesvirus genomes. In Rapp F, *Oncogenic Herpesviruses volume I*. Florida: CRC Press. 1980: 2-16.
39. Kaschka-Dierich C, Adams A, Lindahl T, Bornkamm GW, Bjursell G, Klein G. Intracellular forms of Epstein-Barr virus DNA in human tumor cells in vitro. 1976. *Nature* 260: 302-306.
40. Lindahl T, Adams A, Bjursell G, Bornkamm GW, Kaschka-Dierich C, Jehn U. Covalently closed circular duplex DNA of Epstein-Barr virus in a human lymphoid cell line. 1976. *J Mol Biol* 102: 511-530.
41. Adams A, Lindahl T. Epstein-Barr virus genomes with properties of circular DNA molecules in carrier cells. 1975. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 1477-1481.
42. Adams A, Bjursell G, Gussander E, Koliais S, Falk L, Lindahl T. Size of the intracellular circular Epstein-Barr virus DNA molecules in infectious mononucleosis-derived human lymphoid cell lines. 1979. *J Virol* 29: 815-817.
43. Zur Hausen H, Schulte-Holthausen H. Presence of Epstein-Barr virus nucleic acid homology in a "virus free" line of Burkitt tumor cells. 1970. *Nature* 227: 245-247.

44. Nonoyama M, Pagano J. Detection of Epstein-Barr virus viral genome in nonproductive cells. 1971. *Nature New Biology* 233: 103-106.
45. Andiman W, Gradoville L, Heston R, Neydorff ME, Savage G, Kitchingman DS, Miller G. Use of cloned probes to detect Epstein-Barr viral DNA in tissues of patients with neoplastic and lymphoproliferative diseases. 1983. *J Infect Dis* 148: 967-977.
46. Henderson A, Ripley S, Heller M, Elliott K. Chromosome site for Epstein-Barr virus DNA in a Burkitt tumor cell line and in lymphocytes growth-transformed in vitro. 1983. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 1987-1991.
47. Manolov G, Manolova Y. Marker band in one chromosome 14 from Burkitt lymphomas. 1972. *Nature* 237: 33-34.
48. Jarvis JE, Ball G, Rickinson AB, Epstein MA. Cytogenetic studies on human lymphoblastoid cell lines from Burkitt's lymphomas and other sources. 1974. *Int J Cancer* 14: 716-721.
49. Klein G. Lymphoma development in mice and humans: Diversity of initiation is followed by convergent cytogenetic evolution. 1979. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 2442-2446.
50. Douglas EC, Hargrath IT, Lee EC, Whang-Peng J. Cytogenetic studies in Non-African Burkitt lymphoma. 1980. *Blood* 55: 148-155.
51. Gerber P, Nonoyama M, Lucas S, Perlin E, Goldstein LI. Oral excretion of Epstein-Barr virus by healthy subjects and patients with infectious mononucleosis. 1972. *Lancet* 2: 988-989.
52. Chang RS, Golden HD. Transformation of human leucocytes by throat washing from infectious mononucleosis patients. 1971. *Nature* 234: 359-360.
53. Miller G, Niederman JC, Andrews LL. Prolonged oropharyngeal excretion of Epstein-Barr virus after infections mononucleosis 1973. *N Engl J of Med* 288: 229-232.
54. Jondal M, Klein G. Surface markers on human B and T lymphocytes. 1973. *J Exp Med* 138: 1365-1377.
55. Miller G, Grogan E, Heston L, Robinson J, Smith D. Epstein-Barr viral DNA: Infectivity for human placental cells. 1981. *Science* 212: 452-455.
56. Volsky DJ, Klein G, Volsky B, Shapiro IM. Production of infectious Epstein-Barr virus in mouse lymphocytes. 1981. *Nature* 293: 399-401.
57. Graessman A, Wolf H, Bornkamm GW. Expression of Epstein-Barr virus genes in different cell types after microinjection of viral DNA. 1980. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 433-436.

58. Volsky DJ, Shapiro IM, Klein G. Transfer of Epstein-Barr virus receptors to receptor-negative cells permits virus penetration and antigen expression. 1980. Proc Natl Acad Sci USA 77: 5453-5457.
59. Koide N, Wells A, Volsky DJ, Shapiro IM, Klein G. The detection of Epstein-Barr virus receptors utilizing radio labelled virus. 1981. J Gen Virol. 54: 191-195.
60. Klein E, Klein G, Nadkarni JS, Nadkarni JJ, Wigzell H, Clifford P. Surface IgM-kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and derived culture lines. 1968. Cancer Res 28: 1300-1310.
61. Nilsson K, Ponten J. Classification and biological nature of established human hematopoietic cell lines. 1975. Int J Cancer 15: 321-341.
62. Ben-Bassat H, Polliack A, Mitrani-Rosenbaum S, Reichert F, Froimovici M, Goldblum N. A comparative study of human cell lines derived from patients with lymphoma, leukemia and infectious mononucleosis. 1977. Cancer 40: 1481-1491.
63. Kaplan HS, Goodenow RS, Garfher S, Bieber MM. Biology and virology of the human malignant lymphomas. 1979. Cancer 43: 1-24.
64. Magrath IT, Pizzo PA, Whang-Peng J, Douglass EC, Alabaster O, Gerber P, Freeman CB, Nouikous L. Characterization of lymphoma derived cell lines: Comparison of cell lines positive and negative for Epstein-Barr virus nuclear antigen. I. physical, cytogenetic and growth characteristics. 1980. JNCI 64: 465-476.
65. Magrath IT, Freeman CB, Pizzo P, Gadek J, Jaffe E, Santaella M, Hammer C, Frank M, Reaman G, Novikous L. Characterization of lymphoma derived cell lines: Comparison of cell lines positive and negative for Epstein-Barr virus nuclear antigen. II. surface markers. 1980. JNCI 64: 477-483.
66. Benjamin D, Magrath IT, Maguire R, Janus C, Tood HD, Parsons RG. Immunoglobulin secretion by cell lines derived from African and American undifferentiated lymphomas of Burkitt's and non-Burkitt's type. 1982. J Immunol 129: 1336-1342.
67. Nilsson K, Klein G. Phenotypic and cytogenetic characteristics of human B lymphoid cell lines and their relevance for the etiology of Burkitt's lymphoma. 1982. Adv Cancer Res 37: 319-371.
68. Polliack A, Gamliel H, Ben Bassat H, Gurfel D, Leizerowitz R, Minowada J. Surface morphology and membrane phenotype of cultured human leukemia-lymphoma cells. 1983. Cancer 51: 72-79.

69. Klein G, Yefenof E, Falk K, Westman A. Relationship between Epstein-Barr virus-production and the loss of the EBV receptor/complement receptor complex in a series of sublines derived from the same original Burkitt's lymphoma. 1978. *Int J Cancer* 21: 552-560.
70. Wells A, Koide N, Eggertsen G, Lundwall A, Godal T, Steen HB, Klein G. Epstein-Barr virus binding to virus carrying cell lines in enhanced in the presence of C3 and C3d. 1984. *J Gen Virol* 65: 507-513.
71. Seigneurin JM, Vuillaume M, Lenoir G, De-The G. Replication of Epstein-Barr virus: Ultrastructured and immunofluorescent studies of P3HR-1 superinfected Raji cells. 1977. *J Virol* 24: 836-845.
72. Goodman SR, Prezyna C, Benz WC. Two Epstein-Barr virus-associated DNA polymerase activities. 1978. *J Biol Chem* 253: 8617-8628.
73. Ooka T, Lenoir G, Daillie J. Characterization of an Epstein-Barr virus-induced DNA polymerase. 1979. *J Virol* 29: 1-10.
74. Cheng YC, Chen JY, Hoffmann PJ, Glaser R. Studies on the activity of DNase associated with the replication to the Epstein-Barr virus. 1980. *Virology* 100: 334-338.
75. Ooka T, Calender A, Turenne M, Daillie J. Effect of arabinofuranosylthymine on the replication of Epstein-Barr virus and relationship with a new induced thymidine kinase activity. 1983. *J Virology* 46: 187-195.
76. Sixbey JW, Pagano JS. Epstein-Barr virus transformation of human B lymphocytes despite inhibition of viral polymerase. 1985. *J Virology* 53: 299-301.
77. Miller G. The oncogenicity of Epstein-Barr virus. 1974. *J Infect Dis* 130: 187-205.
78. Henle W, Diehl V, Kohn G, Zur Hausen H, Henle G. Herpes type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells. 1967. *Science* 157: 1064-1065.
79. Miller G, Lisco H, Kohn HI, Stitt D. Establishment of cell line from normal adult human blood leukocytes by exposure to Epstein-Barr virus and neutralization by human sera with Epstein-Barr virus antibody. 1971. *P S Exp Biol Med* 137: 1459-1465.
80. Aya T, Osato T. Early events in transformation of human cord leukocytes by Epstein-Barr virus: Induction of DNA synthesis, mitosis and the virus associated nuclear antigen synthesis. 1974. *Int J Cancer* 14: 341-347.

81. Henderson E, Miller G, Robinson J, Heston L. Efficiency of transformation of lymphocytes by Epstein-Barr virus. 1977. *Virology* 76: 152-163.
82. Zerbini M, Ernberg I. Can EBV infect and transform all the B-lymphocytes of human cord blood? 1983. *J Gen Virol* 64: 539-547.
83. Miller G, Lipman M. Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed Marmoset leucocytes. 1973. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 190-194.
84. Falk L, Wolfe L, Deinhardt F, Paciga J, Dombos L, Klein G, Henle W, Henle G. Epstein-Barr virus: Transformation of non-human primate lymphocytes in vitro. 1974. *Int J Cancer* 13: 363-376.
85. Falk L, Wright J, Wolfe L, Deinhardt F. Herpesvirus ateles: Transformation in vitro of Marmoset splenic lymphocytes. 1974. *Int J Cancer* 14: 244- 251.
86. Shope T, Dechairo D, Miller G. Malignant lymphoma in cotton-top marmosets after inoculation with Epstein-Barr virus. 1973. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 2487-2491.
87. Epstein MA, Zur Hausen H, Ball G, Rabin H. Pilot experiments with EB virus in owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). III. Serological and biochemical findings in an animal with reticuloproliferative disease. 1975. *Int J Cancer* 15: 17-22.
88. Frank A, Andiman WA, Miller G. Epstein-Barr virus and nonhuman primates: Natural and experimental infection. 1976. *Adv Cancer Res* 23: 171-210.
89. Miller G, Shope T, Coope D, Waters L, Pagano J, Bornkamm GW, Henle W. Lymphoma in cotton-top marmosets after inoculation with EBV: tumor incidence, histologic spectrum and antibody responses, demonstration of viral DNA, and characterization of viruses. 1977. *J Exp Med* 145: 948-967.
90. Rabin H, Neubauer RH, Hopkins RF, Levy BM. Characterization of lymphoid cell lines established from multiple Epstein-Bar virus (EBV)-induced lymphomas in a cotton-top marmoset. 1977. *Int J Cancer* 20: 44-50.
91. Sundar SK, Levine PH, Ablashi DV, Leiseca SA, Armstrong GR, Cicmanec JL, Parker GA, Nonoyama M. EBV induced malignant lymphoma in a white-lipped marmoset. 1981. *Int J Cancer* 27: 107-111.
92. Ziegler JL. Burkitt's lymphoma. 1981. *N Eng J Med* 305: 735-745.
93. Gunven P. Burkitt's lymphoma-a human tumor model system for immunological studies. 1975. *Biochim Biophys Acta* 417: 187-210.

94. Burkitt DP. Etiology of Burkitt's lymphoma-an alternative hypothesis to a vectored virus. 1969. JNCI 42: 19-28.
95. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. 1964. Lancet 2: 702-703.
96. Henle G, Henle W, Clinfford P, Diehl V, Kafuko GW, Kirya BG, Klein G, Morrow RH, Munube GMR, Pike P, Tukei PM, Ziegler JL. Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and control groups. 1969. JNCI 43: 1147-1157.
97. Reedman BM, Klein G. Cellular localization of an EBV-associated complement-fixing antigen in producer and non-producer lymphoblastoid cell lines. 1973. Int J Cancer 11: 499-520.
98. Reedman BM, Klein G, Pope JH, Walters MK, Hilgers J, Singh S, Johansson B. Epstein-Barr virus-associated complement-fixing and nuclear antigens in Burkitt lymphoma biopsies. 1974. Int J Cancer 13: 755-763.
99. Lindahl T, Klein G, Reedman BM, Johansson B, Singh S. Relationship between Epstein-Barr virus (EBV) DNA and the EBV-determined nuclear antigen (EBNA) in Burkitt lymphoma biopsies and other lymphoproliferative malignancies. 1974. Int J Cancer 13: 764-772.
100. OIweny CLM, Atine I, Kaddu-Mukasa A, Owor R, Anderson-Anvret M, Klein G, Henle W, De-The G. Epstein-Barr virus genome studies in Burkitt's and non-Burkitt's lymphomas in Uganda. 1977. JNCI 58: 1191-1196.
101. De-The G, Geser A, Day NE, Tukei PM, Williams EH, Beri DP, Smith PG, Dean AG, Bornkamm GW, Feorino P, Henle W. Epidemiological evidence for causal relationship between Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma from Ugandan prospective study. 1978. Nature 274: 756-761.
102. Ladjadj Y, Philip T, Lenoir GM, Tazerout FZ, Bendisari K, Boukheloua R, Biron P, Brunat-Mentigny M, Aboulola M. Abdominal Burkitt type lymphomas in Algeria. 1984. Br J Cancer 49: 503-512.
103. Goldblum, N, Ben-Bassat H, Mitrani S, Anderson-Anvret M, Goldblum T, Angai E, Ramot R, Klein G. A case of an Epstein-Barr virus (EBV) genome-carrying lymphoma in an Israeli Arab child. 1977. Eur J Cancer 13: 693-698.
104. Anderson M, Klein G, Ziegler JL, Henle W. Association of Epstein-Barr viral genomes with American Burkitt lymphoma. 1976. Nature 260: 357-358.
105. Pagano JS, Huang CH, Levine P. Absence of Epstein-Barr viral DNA in American Burkitt's lymphoma. 1973. N Engl J Med 289: 1395-1399.

106. Henle W, Henle G, Ho HC, Burtin P, Cachin Y, Clifford P, Schryver A, De-The G, Diehl V, Klein G. Antibodies to Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma, other head and neck neoplasms, and control groups. 1970. JNCI 44: 225-231.
107. Huang DP, Ho HC, Henle W, Henle G. Demonstration of Epstein-Barr virus-associated nuclear antigen in Nasopharyngeal carcinoma cells from fresh biopsies. 1974. Int J Cancer 14: 580-588.
108. Klein G, Giovanello BC, Lindahl T, Fialkow PJ, Singl S, Stehlin JS. Direct evidence for the Epstein-Barr virus DNA and nuclear antigen in malignant epithelial cells from patients with poorly differentiated carcinoma of the nasopharynx. 1974. Proc Natl Acad Sci USA 71: 4737-4741.
109. Glaser R, De-The G, Lenoir G, Ho JHC. Superinfection of epithelial nasopharyngeal carcinoma cells with Epstein-Barr virus. 1976. Proc Natl Acad Sci USA 73: 960-963.
110. Rickinson A. Epstein-Barr virus in epithelium. 1984. Nature 310: 399.
111. Sixbey JW, Nedrud JG, Raab-traub N, Hanes RA, Pagano JS. Epstein-Barr virus replication in orofarengeal epithelial cells. 1984. N Engl J Med 310: 1225-1230.
112. Desgrandes C, Wolf H, De-The G, Shanmugaratnam K, Cammoun N, Ellouz R, Klein G, Lennert K, Munoz N, Zur Hausen H. Nasopharyngeal carcinoma. X. Presence of Epstein-Barr genomes in separated epithelial cells of tumors in patients from Singapore, Tunisia and Kenya. 1975. Int J Cancer 16: 7-15.
113. De-The G, Ho JHC, Ablashi DV, Day NE, Macario AJL, Martin-Berthelon MC, Pearson G, Sohler R. Nasopharyngeal carcinoma. IX. Antibodies to EBNA and correlation with response to other EBV antigens in Chinese patients. 1975. Int J Cancer 16: 713-721.
114. Henle G, Henle W. Immunfluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. 1966. J Bacteriol 91: 1248-1256.
115. Henle G, Henle W, Diehl V. Relation of Burkitt's tumor-associated Herpes-type virus to infectious mononucleosis. 1968. Proc Natl Acad Sci USA 59: 94-101.
116. Evans AS, Niederman JC, McCollum RW. Seroepidemiologic studies of infectious mononucleosis with EB virus, 1968. N Engl J Med 279: 1121-1127.
117. Biggar RJ, Henle W, Fleisher G, Böcker J, Lennette ET, Henle G. Primary Epstein-Barr virus infections in African infants. I. Decline of maternal antibodies and time of infections. 1978. Int J Cancer 22: 239-243.

118. Henle G, Henle W, Horwitz CA. Antibodies to Epstein-Barr virus-associated nuclear antigen in infectious mononucleosis. 1974. *J Infect Dis* 130: 231-239.
119. Rickinson AB, Jarvis JE, Crawford DH, Epstein MA. Observations on the type of infection by Epstein-Barr virus in peripheral lymphoid cells of patients with infectious mononucleosis. 1974. *Int J Cancer* 14: 704-715.
120. Klein E, Ernberg I, Masucci MG, Szigeti R, Wu YT, Masucci G, Svedmyr E. T-cell response to B cells and Epstein-Barr virus antigens in infectious mononucleosis. 1981. *Cancer Res* 41: 4210-4215.
121. Jehn U, Sauer H, Wolf H, Wilmanns W. Hodgkin's disease following infectious mononucleosis. 1981. *Eur J Cancer* 17: 477-479.
122. Zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Wolf H, Dörries K, Egger H. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. II. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human Herpes group viruses. 1974. *Int J Cancer* 13: 657-664.
123. Lindemalm C, Biberfeld P, Björkholm M, Henle G, Henle W, Holm G, Johansson B, Klein G, Wellstedt H. Epstein-Barr virus-associated antibody pattern in untreated non-Hodgkin lymphoma patients. Relationship to clinical variables and lymphocyte functions. 1983. *Int J Cancer* 32: 675-682.
124. Evans AS, Gutensohn NM. A Population-based case-control study of EBV and other viral antibodies among persons with Hodgkin's diseases and their siblings. 1984. *Int J Cancer* 34: 149-157.
125. Brichacek B, Suchankova A, Hirsch I, Sibl O, Rezacova D, Zavadova H, Vonka V. Presence of Epstein-Barr DNA in tonsillar tissues. 1981. *Acta Virol* 25: 361-371.
126. Saemundsen AK, Albeck H, Hansen JPH, Nielsen NH, Anvret M, Henle W, Henle G, Thomsen KA, Kristensen HK, Klein G. Epstein-Barr virus in nasopharyngeal and salivary gland carcinomas of Greenland Eskimos. 1982. *Br J Cancer* 46: 721-728.
127. Bornkamm GW, Stein H, Lennert K, Rüggeberg F, Bartels H, Zur Hausen H. Attempts to demonstrate virus specific sequences in human tumors. IV. EB viral DNA in European Burkitt lymphoma and immunoblastic lymphadenopathy with excessive plasmacytosis. 1976. *Int J Cancer* 17: 177.
128. Pirtilo DT. Immune deficiency predisposing to EBV-induced lymphoproliferative diseases: The X-linked lymphoproliferative syndrome as a model. 1981. *Adv Cancer Res* 34: 279-312.

129. Henle W, Henle G. Epstein-Barr-specific serology in immunologically compromised individuals. 1981. *Cancer Res* 41: 4222-4225.
130. Purtilo DT, Sakamoto K, Saemundsen AK, Sullivan JL, Synnerholm AC, Anvret M, Pritchard J, Sloper C, Sieff C, Pincott J, Pachman L, Rich K, Cruzei F, Cornet JA, Collins R, Barnes N, Knight J, Sandstedt B, Klein G. Documentation of EBV infection of immunodeficient patients with threatening lymphoproliferative diseases by clinical virological and immunopathological studies. 1981. *Cancer Res* 41: 4226-4236.
131. Saemundsen AK, Purtilo DT, Sakamoto K, Sullivan JL, Synnerholm AC, Hanto D, Simmons R, Anvret M, Collins R, Klein G. Documentation of EBV infection in immunodeficient patients with life-threatening lymphoproliferative diseases by EBV complementary RNA/DNA and viral DNA/DNA hybridization. 1981. *Cancer Res* 41: 4237-4242.
132. Reece ER, Gartner JG, Seemayer TA, Joncas JH, Pagano JS. Epstein-Barr virus in a malignant lymphoproliferative disorder of B-cells occurring after thymic epithelial transplantation for combined immunodeficiency. 1981. *Cancer Res* 41: 4243-4247.
133. Purtilo DT, Liao SA, Sakamoto K, Snyder LM, Deflorio D, Bhawan J, Paguin L, Yang JPS, Hutt-Fletcher LM, Muralidharan K, Raffa P, Saemundsen AK, Klein G. Diverse familial malignant tumors and Epstein-Barr virus. 1981. *Cancer Res* 41: 4248-4252.
134. Hanto DW, Frizzera G, Purtilo DT, Sakamoto K, Sullivan JL, Saemundsen AK, Klein G, Simmons RL, Najarian JS. Clinical spectrum of lymphoproliferative disorders in renal transplant recipients and evidence for the role of EBV. 1981. *Cancer Res* 41: 4253-4261.
135. Frizzera G, Hanto DW, Gajl-Peczalska KJ, Rosai J, McKenna RW, Sibley RK, Holahan KP, Lindquist LL. Polymorphic diffuse B-cell hyperplasias and lymphomas in renal transplant recipient. 1981. *Cancer Res* 41: 4262-4279.
136. Look TA, Naegele RF, Callihan T, Herrod HG, Henle W. Fatal EBV infection in a child with acute lymphoblastic leukemia in remission. 1981. *Cancer Res* 41: 4280-4283.
137. Masucci MG, Szigeti R, Ernberg I, Björkholm M, Mellstedt H, Henle G, Henle W, Pearson G, Masucci G, Svedmyr E, Johnson B, Klein G. Cell mediated immune reactions in three patients with malignant lymphoproliferative diseases in remission and abnormally high EBV antibody titers. 1981. *Cancer Res* 41: 4292-4301.
138. Klein G, Purtilo D. Summary: Symposium on EBV-induced lymphoproliferative diseases in immunodeficient patients. 1981. *Cancer Res* 41: 4302-4304.

139. Sullivan JL, Medveczky P, Forman SJ, Baker SM, Monroe JE, Mulder C. Epstein-Barr induced lymphoproliferation. 1984. *N Eng J Med* 311: 1163-1167.
140. Hardy C, Feusner J, Harada S, Sanger W, Von Schmidt B, Yetz J, Saemundsen A, Lennette E, Linder J, Seeley JK, Lubin B, Purtilo DT. Fatal EBV-induced lymphoproliferation complicating acute lymphoblastic leukemia. 1984. *J Pediatr* 105: 64-67.
141. Purtilo DT. EBV-induced oncogenesis immune-deficient individual. 1980. *Lancet* 1: 300-303.
142. Pearson GR, Henle G, Henle W. Production of antigens associated with Epstein-Barr virus in experimentally infected lymphoblastoid cell lines. 1971. *JNCI* 46: 1243-1250.
143. Grandund DJ, Pearson GR. Membrane antigen expression in Epstein-Barr virus-infected Raji cells in the presence of phosphonoacetic acid. 1977. *Virology* 83: 217-220.
144. Pearson GR, Orr TW. Antibody-dependent lymphocyte cytotoxicity against cells expressing Epstein-Barr virus antigens. 1976. *JNCI* 56: 485-488.
145. Henle W, Ho HC, Henle G, Kwan HC. Antibodies to Epstein-Barr virus-related antigens in nasopharyngeal carcinoma. Comparison of active cases with long-term survivors. 1973. *JNCI* 51: 361-369.
146. Thorley-Lawson DA, Edson CM. Polypeptides of the Epstein-Barr virus membrane antigen complex. 1979. *J Virol* 32: 458-467.
147. Hoffman GJ, Lazarowitz SG, Hayward SD. Monoclonal antibody against a 250 000 dalton glycoprotein of Epstein-Barr virus identifies a membrane antigen and a neutralizing antigen. 1980. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 2979-2983.
148. Thorley-Lawson DA, Geilinger K. Monoclonal antibodies against the major glycoprotein (gp350/220) of Epstein-Barr virus neutralise infectivity. 1980. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 5307-5311.
149. Slovin SF, Frisman DM, Tsoukas CD, Royston I, Baird SM, Wormsley SB, Carson DA, Vaughan JH. Membrane antigen on Epstein-Barr virus-infected human B-cells recognized by a monoclonal antibody. 1982. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 2649-2653.
150. Sairenji T, Hinuma Y, Sekizawa T, Yoshida M. Appearance of early and late components of Epstein-Barr virus-associated membrane antigen in Daudi cells superinfected with P3HR-1 virus. 1977. *J Gen Virol* 38: 111-120.

151. Henle G, Henle W, Klein G. Demonstration of two distinct components in the early antigen complex of EBV-infected cells. 1971. *Int J Cancer* 8: 272-282.
152. Gergely L, Klein G, Ernberg F. The action of DNA antagonists on Epstein-Barr virus-associated early antigen in Burkitt lymphoma lines. 1971. *Int J Cancer* 7: 293-302.
153. Henle W, Henle G, Niederman JC, Klemola E, Haltia K. Antibodies to early antigens induced by EBV in infectious mononucleosis. 1971. *J Infect Dis* 124: 58-67.
154. Henle W, Henle GE, Horwitz CA. Epstein-Barr virus specific diagnostic tests in infectious mononucleosis. 1974. *Hum Pathol* 5: 551-565.
155. Svedmyr E, Jondal M. Cytotoxic effector cells specific for B cell lines transformed by EBV are present in patients with infectious mononucleosis. 1975. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 1622-1626.
156. Henle W, Moss JD, Rickinson AB, Wallace LE, Epstein MA. Patterns of antibodies to Epstein-Barr virus-induced early antigens in Burkitt's lymphoma. Comparison of dying patients with long-term survivors. 1973. *JNCI* 50: 1163-1173.
157. Moss JD. Sequential appearance of EBV-nuclear and lymphocyte-detected membrane antigens in B cell transformation. 1981. *Nature* 291: 664-667.
158. Suzuki M, Hinuma Y. Evaluation of EBV-associated nuclear antigen with various human cell lines. 1974. *Int J Cancer* 14: 753-761.
159. Luka J, Klein G, Henle W, Henle G. Detection of the EBV-determined nuclear antigen (EBNA) in Burkitt's lymphoma and NPC biopsies by the Acid fixed nuclear binding (AFNB) technique. 1978. *Cancer Lett* 4: 199-205.
160. Lenoir G, De-The G, Virelizier JL, Griscelli C. Epstein-Barr nuclear antigen (EBNA)-positive cells in a lymph-node of a child with severe primary EBV infection. 1978. *IARC Sci Publ* 24: 733-738.
161. Gergely L, Czegledy J, Vaczi L, Szalka A, Berenyi E. Cells containing Epstein-Barr nuclear antigen (EBNA) in peripheral blood. 1979. *Acta Microbiol Acad Sci Hung* 26: 41-45.
162. Robinson J, Smith D, Niederman J. Mitotic EBNA-positive lymphocytes in peripheral blood during infectious mononucleosis. 1980. *Nature* 287: 334-335.

163. Boguszakova L, Hirsch I, Brichacek B, Vonka V. Relationship between Epstein-Barr nuclear antigen and DNA genome number in superinfected and induced lymphoblastoid cell lines. 1983. *J Gen Virol* 64: 887-894.
164. Ernberg I, Klein G, Giovanella BC, Stehlin J, McCormick KJ, Anderson-Anvret M, Aman P, Killander D. Relationship between the amounts of EBV-DNA and EBNA per cell, clonability and tumorigenicity in two EBV-negative lymphoma lines and their EBV-coverted sublines. 1983. *Int J Cancer* 31: 163-169.
165. Fischer DK, Robert MF, Shedd D, Summers WP, Robinson JE, Wolac J, Stefano JE, Miller G. Identification of Epstein-Barr nuclear antigen polypeptide in mouse and monkey cells after gene transfer with a cloned 2.9-kilobase-pair subfragment of the genome. 1984. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 43-47.
166. Kamata T, Takaki K, Hinuma Y, Watanabe Y. Protein kinase activity associated with Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen. 1981. *Virology* 113: 512-520.
167. Ohno S, Luka J, Lindahl T, Klein G. Identification of a purified complement-fixing antigen as the Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen (EBNA) by its binding to metaphase chromosomes. 1977. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 1605-1609.
168. Matsuo T, Hibi N, Nishi S, Hirau H, Osato T. Studies on EBV related antigen III. Purification of the virus-determined nuclear antigen (EBNA) from non-producer Raji cells. 1978. *Int J Cancer* 22: 747-752.
169. Luka J, Lindahl T, Klein G. Purification of the EBV-determined nuclear antigen from EBV-transformed human lymphoid cell lines. 1978. *J Virol* 27: 604-611.
170. Sculley TB, Kreofsky T, Pearson GR, Spelsberg TC. Partial purification of the EBV nuclear antigen(s). 1973. *J Biol Chem* 258: 3974-3982.
171. Grogan EA, Summers WP, Dowling S, Duane S, Gradoville L, Miller G. Two EB viral nuclear neoantigens distinguished by gene transfer, serology and chromosome binding. 1983. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 7650-7653.
172. Schmitz H, Kampa D. Amplified direct immunofluorescence (AMD1) for detection of EBV nuclear antigen. 1979. *J Immunol Methods* 26: 173-186.
173. Henle W, Henle G, Horwitz CA. Infectious mononucleosis and EBV-associated malignancies. 1979. In: *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*. American Public Health Association, Inc.

174. Bird AG, Britton S. The relationship between Epstein - Barr virus and Lymphoma. 1982. Semin Hematol 19: 285-300.
175. Klein G. The Epstein - Barr virus and neoplasia. 1975. N Engl J Med 293: 1353-1357.
176. Gerber P, Levine PH. Epstein - Barr virus and human malignancy. 1977. Ann Intern Med 86: 323-336.
177. Simons MJ, Shanmugaratnam K. The biology of nasopharyngeal carcinoma. 1982. UICC Technical Report Series 71: 1-61.