

Ruolo del virus di Epstein-Barr nella patogenesi dei disordini linfoproliferativi post-trapianto

Riccardo Dolcetti

Unità di Immunovirologia e Bioterapie, Dipartimento della Ricerca Pre-Clinica ed Epidemiologica, Centro di Riferimento Oncologico, I.R.C.C.S. - Istituto Nazionale Tumori, Aviano (PN)

INTRODUZIONE

I disordini linfoproliferativi post-trapianto (PTLD) rappresentano un gruppo eterogeneo di linfoproliferazioni patologiche, prevalentemente a carico di linfociti B, che insorgono nel contesto di una immunodepressione iatrogena in pazienti che hanno subito un trapianto d'organo o di cellule staminali emopoietiche. A differenza di quanto si verifica per i linfomi non-Hodgkin dei pazienti immunocompetenti, la maggioranza dei PTLD è associata all'infezione da parte del virus di Epstein-Barr (EBV), come dimostrato dalla presenza del virus nelle cellule di tali linfoproliferazioni. Quadri clinico-patologici simili ai PTLD si riscontrano anche in associazione con altre condizioni di immunodeficienza, sia di tipo congenito che acquisito (infezione da HIV), e sono anch'essi prevalentemente EBV-correlati (23, 43). Tutte queste linfoproliferazioni sono la conseguenza di alterazioni delle risposte immuni che normalmente tengono sotto controllo l'infezione da EBV e che impediscono al virus di estrinsecare il suo potenziale trasformante nei confronti del linfocita B. Tuttavia, alla complessa patogenesi dei PTLD concorrono anche altri fattori, ancora poco noti, sia legati alla cellula EBV-infettata che all'ospite portatore del trapianto. Nella presente rassegna verranno riassunte le recenti acquisizioni sulla biologia dell'infezione da EBV, con particolare riferimento al ruolo di tale virus nella patogenesi dei PTLD. Data la loro rilevanza in termini di gestione clinica del paziente trapiantato, verranno inoltre discussi gli aspetti metodologici e le problematiche applicative inerenti il monitoraggio del carico di EBV nel sangue periferico di questi pazienti.

Il virus

L'EBV è un γ -herpesvirus umano ubiquitario che infetta più del 95% della popolazione mondiale (68). La maggior parte delle infezioni primarie si verificano nella prima infanzia e sono generalmente asintomatiche. Tuttavia, quando l'infezione primaria si verifica più tardivamente, come nei paesi ad elevati standard socio-economici, l'EBV può causare la mononucleosi infettiva, un disordine linfoproliferativo autolimitante caratterizzato dalla presenza nel torrente circolatorio di un ele-

vato numero di linfociti B EBV-infettati e da una massiva espansione oligoclonale di linfociti T CD8+ EBV-specifici (36). La trasmissione del virus si verifica prevalentemente tramite le secrezioni oro-faringee che usualmente contengono virioni infettanti di EBV (95). Queste osservazioni, unitamente al riscontro di un'intensa attività replicativa di EBV in lesioni di leucoplachia orale "hairy" dei pazienti HIV-sieropositivi (26), avevano inizialmente suggerito che le cellule epiteliali potessero rappresentare il sito primario dell'infezione produttiva di EBV. Tuttavia, evidenze più recenti hanno dimostrato in modo conclusivo come siano i linfociti B a costituire il sito della persistenza del virus nell'ospite infettato. È stato infatti dimostrato che l'EBV può essere eradicato in pazienti sottoposti a trapianto di midollo in seguito alla somministrazione di chemioterapia ad alte dosi che elimina le cellule linfoidi dell'ospite ma non quelle dell'epitelio della mucosa oro-faringea (24). Inoltre, in tonsille di pazienti con mononucleosi infettiva, l'EBV è riscontrabile nei linfociti B e non nelle cellule epiteliali (59). Infine, i pazienti affetti da agammaglobulinemia legata al cromosoma X, una malattia caratterizzata da alterazioni della maturazione dei linfociti B, non sono suscettibili all'infezione da parte di EBV (21).

La presenza del DNA di EBV e la costante espressione di proteine virali indicano come l'EBV sia probabilmente coinvolto nella patogenesi di un numero crescente di neoplasie umane. Queste comprendono linfomi a carico di cellule B, T e natural killer (NK), quali il linfoma di Burkitt endemico, le linfoproliferazioni associate all'immunodepressione, il linfoma di Hodgkin, i linfomi a cellule T periferiche e i linfomi nasali a cellule T/NK (68). L'EBV è inoltre associato allo sviluppo di una serie di neoplasie di origine non linfoide quali il carcinoma indifferenziato del rinofaringe (17), una frazione di carcinomi dello stomaco (34) e alcuni leiomioidi insorti in pazienti con AIDS o portatori di trapianto d'organo (38). Questo spettro di tumori EBV-correlati riflette il prevalente anche se non esclusivo tropismo del virus nei confronti di due distinti tipi cellulari: il linfocita B e le cellule epiteliali.

L'infezione di tali bersagli cellulari si verifica attraverso meccanismi diversi, soltanto in parte definiti, e si traduce nell'espressione di un diverso pattern di proteine virali.

Fisiopatologia dell'infezione dei linfociti B da parte di EBV

Come è noto, l'EBV ha uno spiccato tropismo per i linfociti B umani che vengono rapidamente infettati ed immortalizzati *in vitro* dal virus (68). L'ingresso dell'EBV in tali cellule è principalmente mediato dal legame della glicoproteina gp350 dell'envelope virale con il recettore C3d del complemento (o CD21) espresso sulla superficie dei linfociti B (22). Caratteristica peculiare di tali cellule è la capacità di supportare la replicazione del virus o l'infezione latente a seconda dello stato differenziativo o di attivazione funzionale della cellula. I linfociti B memoria rappresentano infatti il principale sito di latenza che consente al virus di sfuggire al riconoscimento da parte del sistema immunitario (3-5). Al contrario, i linfociti B terminalmente differenziati e pertanto destinati a morire, le plasmacellule, sono permissivi per l'infezione produttiva che consente la diffusione del virus sia in altri organi dell'ospite infettato che ad altri individui (85). In soggetti adulti sani, l'EBV è presente in circa 1-50 linfociti B per milione di cellule circolanti (2). I linfociti B memoria EBV-infettati possono essere completamente silenti per l'espressione di proteine virali (Latenza 0) o esprimere la proteina di membrana latent membrane protein 2 (LMP-2) da sola o insieme all'antigene nucleare EBNA-1 (Latenza I) (14, 54). Come sarà discusso successivamente, l'espressione di queste proteine virali è di cruciale importanza per l'induzione ed il mantenimento della persistenza di EBV nei linfociti B. Infatti, l'EBNA-1 è un importante regolatore della replicazione virale e consente la persistenza dell'episoma virale all'interno della cellula infettata (96), mentre la proteina LMP-2 promuove la sopravvivenza dei linfociti B EBV-infettati inibendo la riattivazione del virus indotta da stimoli dell'ospite (50).

In presenza di un difettoso controllo immunologico dell'infezione da EBV, come si osserva *in vitro* o in pazienti immunodepressi, le cellule B EBV-infettate presentano un pattern di latenza più allargato (Latenza III) caratterizzato dall'espressione di 6 proteine nucleari (EBNA-1-6) e 3 proteine di membrana (LMP-1, -2A e -2B) (68). Questa forma di latenza è stata anche denominata "programma proliferativo" in quanto associato alla crescita autonoma dei linfociti B, come esemplificato dalle linee linfoblastoidi B *in vitro* (85). Queste cellule esprimono elevati livelli di marcatori immunofenotipici di attivazione (CD23,

CD40) e di molecole di adesione (ICAM-1, LFA-1, LFA-3, CD80) e presentano numerose somiglianze con gli immunoblasti B normali attivati in seguito all'interazione con l'antigene verso il quale tali cellule sono specificamente reattive (68). L'attivazione del "programma proliferativo" probabilmente contribuisce all'espansione del pool iniziale di linfociti B EBV-infettati, aumentando in tal modo la probabilità che il virus raggiunga il sito privilegiato di persistenza, le cellule B memoria.

Una forma intermedia di latenza è stata recentemente identificata in linfociti B che si localizzano nei centri germinativi dei follicoli linfatici (4,5). In queste cellule, l'espressione di proteine di EBV è ristretta all'EBNA-1 e alle 3 proteine di membrana (LMP-1, -2A e -2B), rappresentando il cosiddetto "programma di salvataggio" (Latenza II) che avrebbe la funzione di consentire la sopravvivenza dei linfoblasti EBV-infettati e la loro differenziazione a cellule B memoria (85). Un simile pattern di espressione di proteine virali è riscontrabile anche nei casi di linfoma di Hodgkin EBV-correlati, neoplasia che è stata recentemente identificata come di derivazione dal lineage B cellulare (79). Una ulteriore forma di interazione dell'EBV con i linfociti B è riscontrabile nelle cellule di linfoma di Burkitt EBV-associato, che corrisponde prevalentemente alle forme endemiche dell'Africa equatoriale e della Nuova Guinea (29). In tali linfomi è evidenziabile soltanto l'espressione di EBNA-1, mentre i geni codificanti per gli altri EBNA e per le proteine LMP-1 e -2 sono silenziati in seguito a metilazione dei corrispondenti promotori (37,53).

Meccanismi della trasformazione indotta da EBV

L'EBV contribuisce alla immortalizzazione/trasformazione di diversi tipi di cellule attraverso l'attività di proteine virali capaci di interferire con vie di trasduzione del segnale che controllano la proliferazione e/o la sopravvivenza della cellula. Queste proteine codificate da EBV agiscono in modo cooperativo e inducono effetti biologici che differiscono a seconda del tipo di cellula (16).

EBNA-1: Con la possibile eccezione delle cellule B memoria EBV+ circolanti, EBNA-1 è espresso in tutte le forme di latenza di EBV e in tutte le neoplasie EBV-associate, indicando come le proprietà biologiche di tale proteina siano critiche sia per la persistenza del virus che per la trasformazione indotta da EBV (47). EBNA-1 è infatti essenziale per il mantenimento degli episomi di EBV all'interno delle cellule infettate, e svolge un ruolo importante nel controllare l'espressione di geni virali. La struttura di tale proteina è peculiare in quanto la maggior parte della sua porzione

amino-terminale è costituita da ripetizioni di glicina e alanina che risultano di lunghezza variabile nei vari isolati di EBV (20). Studi recenti hanno dimostrato che tale dominio è in grado di inibire il processamento della proteina da parte del proteasoma, impedendo in tal modo un'efficace presentazione di epitopi antigenici di EBNA-1 (48). Ciò consentirebbe alle cellule latentemente infettate da EBV di sfuggire al riconoscimento da parte del sistema immune, favorendone la persistenza nell'ospite e contribuendo alla trasformazione indotta da EBV. EBNA-1, tuttavia, sembra essere in grado di indurre anche effetti non di natura immunologica, capaci di contribuire direttamente all'induzione del fenotipo trasformato. Infatti, topi iperesprimenti costitutivamente EBNA-1 nei linfociti B mostrano un'elevata incidenza di linfomi a cellule B (91).

EBNA-2: La proteina EBNA-2 si localizza a livello del nucleo delle cellule EBV+ ed è una delle prime proteine virali espresse in linfociti B infettati da EBV (98). Insieme ad EBNA-5, EBNA-2 stimola l'ingresso nel ciclo cellulare di linfociti B non proliferanti ed è in grado di promuovere la trascrizione sia di geni di EBV che di geni cellulari quali *c-fgr*, *c-myc*, CD21 e CD23 (98). EBNA-2 si è rivelata essenziale per l'immortalizzazione EBV-indotta dei B linfociti e tale attività sembra dipendere strettamente dalla sua interazione con la proteina cellulare RBP-J, un componente fondamentale della cascata di segnali attivata dai recettori della famiglia Notch (93). Mentre in condizioni fisiologiche RBP-J funziona come fattore trascrizionale soltanto in seguito ad attivazione del recettore Notch, in cellule EBV+ che esprimono di EBNA-2, RBP-J forma complessi con EBNA-2 che lo rendono costitutivamente attivo anche in condizioni in cui Notch è silente (98). Pertanto, EBNA-2 può essere considerato alla stregua di un omologo funzionale di un recettore Notch costitutivamente attivato. Il fatto che Notch attivi fisiologicamente una cascata di segnali che regolano lo sviluppo e la proliferazione dei B linfociti (60) rende ragione della rilevanza del contributo dato da EBNA-2 all'immortalizzazione/trasformazione di tali cellule mediata da EBV.

LMP-1: La proteina di membrana LMP-1 si è dimostrata in grado di conferire caratteristiche proprie del fenotipo trasformato quali: ridotta dipendenza da siero per la proliferazione, riduzione dell'inibizione da contatto, crescita indipendente dall'ancoraggio ad una matrice solida e tumorigenicità in modelli animali (15,19,89). Inoltre, studi condotti con ceppi di EBV mutanti hanno dimostrato che l'espressione di LMP-1 è critica per l'immortalizzazione dei linfociti B

(40). Da sola, la proteina LMP-1 è in grado di indurre una gran parte delle alterazioni fenotipiche e funzionali associate all'infezione da EBV quali: aumentata adesione cellulare omotipica, induzione di molecole di adesione (LFA-1, ICAM-1, LFA-3) (55,97), di marcatori di attivazione dei linfociti B (CD23, CD30, CD40, CD71) (11) e di geni anti-apoptotici (*bcl-2*, *bcl-xL*, *Mcl-1*, *A20*) (30, 45, 90). Come per EBNA-1, anche topi transgenici per LMP-1 hanno mostrato un'elevata incidenza di linfomi a cellule B (44). Studi recenti hanno consentito di comprendere i meccanismi responsabili dell'elevato pleiotropismo funzionale mostrato da LMP-1. È stato infatti dimostrato che la corta sequenza amino-terminale e i 6 domini transmembrana della proteina promuovono la formazione di aggregati di molecole di LMP-1 a livello della membrana plasmatica, consentendo ad LMP-1 di funzionare come un recettore costitutivamente attivato (18,46). Ciò si realizza in quanto l'aggregazione di più molecole di LMP-1 favorisce il reclutamento di una serie di secondi messaggeri intracellulari a livello del dominio carbossi-terminale della proteina. La proteina LMP-1 è pertanto in grado di usurpare diverse vie di trasduzione del segnale che sono di cruciale importanza per la regolazione della crescita e della proliferazione dei linfociti B. In particolare, la natura dei secondi messaggeri attivati da LMP-1 suggerisce come questa proteina virale condivida proprietà funzionali con membri della superfamiglia dei recettori del Tumor Necrosis Factor, di cui fa parte anche il CD40 (18,46). Tuttavia, a differenza del CD40 che è normalmente espresso sulla superficie dei linfociti B, la proteina LMP-1 attiva parte della cascata dei segnali stimolata da CD40 indipendentemente dalla presenza del rispettivo ligando. Si ritiene pertanto che il dirottamento di varie vie di trasduzione del segnale operato da LMP-1 conferisca a tale proteina la capacità di contribuire alla patogenesi di molte neoplasie EBV-correlate attraverso l'attivazione simultanea o sequenziale di segnali coinvolti nella regolazione dell'attivazione, proliferazione e sopravvivenza delle cellule.

LMP-2: A differenza di LMP-1, la proteina LMP-2 non sembra essere essenziale per l'immortalizzazione dei linfociti B *in vitro* (49). Tuttavia, la costante espressione di questo gene virale nelle cellule B memoria EBV+ degli individui sani suggerisce che LMP-2 possa rivestire un ruolo rilevante nel mediare la persistenza del virus nell'ospite infettato (2). Osservazioni recenti indicano come LMP-2 attivi segnali capaci di impedire la morte per apoptosi di linfociti B immaturi (10). Ciò è stato messo in relazione con la capacità di LMP-2 di interferire con la via di

transduzione del segnale della fosfatidilinositolo-3-chinasi/Akt (76,83), nota per regolare non solo la sopravvivenza ma anche la proliferazione dei linfociti B (9). E' stato inoltre dimostrato che LMP-2 inibisce il passaggio dalla latenza al ciclo replicativo (litico) di EBV, fisiologicamente innescato dall'attivazione del recettore delle cellule B (BCR) conseguente all'incontro con l'antigene (50). Tale effetto sembra sia dovuto alla capacità di LMP-2 di promuovere la degradazione proteasoma-mediata di secondi messaggeri cellulari attivati dalla stimolazione del BCR (35,92). E' pertanto probabile che, oltre a favorire la persistenza di EBV, le proprietà funzionali attribuite ad LMP-2 possano avere un qualche ruolo nell'induzione e/o nel mantenimento del fenotipo trasformato.

Classificazione e diagnosi dei PTLD

Il termine PTLD generalmente si riferisce ad uno spettro di disordini iperproliferativi dei linfociti B che variano da condizioni benigne, quali sindromi simili alla mononucleosi infettiva e l'iperplasia linfoide policlonale, a quadri francamente maligni quali linfomi a cellule B (o T), che possono anche avere un decorso fulminante (28,57). Sono anche distinte forme di PTLD "polimorfo", con caratteristiche ancora incompletamente definite, che vengono collocati tra i quadri benigni policlonali e le neoplasie francamente monoclonali (28). La diagnosi di neoplasia dovrebbe comprendere la presenza di almeno due dei seguenti criteri: (i) la distruzione dell'architettura linfonodale; (ii) la presenza di popolazioni cellulari monoclonali dimostrata da marcatori cellulari (riarrangiamenti dei geni delle immunoglobuline) e/o virali (analisi del numero delle sequenze ripetute terminali del genoma di EBV); (iii) evidenza di infezione da parte di EBV nelle cellule della linfoprolifera-zione (62). In considerazione dell'elevato numero di quadri clinico-patologici che possono entrare in diagnosi differenziale con i PTLD, è essenziale eseguire un'attenta analisi istopatologica su biopsie tissutali. L'esecuzione di indagini addizionali può essere utile per confermare la diagnosi di PTLD. Queste comprendono la caratterizzazione immunofenotipica, eseguita mediante immunofluorescenza ed analisi in citometria a flusso o con metodiche immunostochimiche, la determinazione dell'espressione degli RNA precoci di EBV (EBER) da parte delle cellule neoplastiche tramite ibridazione *in situ*, e indagini molecolari quali lo studio della clonalità B mediante analisi dei riarrangiamenti dei geni delle immunoglobuline. Ci si può inoltre avvalere dello studio della clonalità di EBV che prevede l'analisi della configurazione molecolare e delle dimensioni delle estremità del genoma del virus. Ciò è possibile in

quanto la circolarizzazione del genoma di EBV che si verifica in seguito ad ogni evento infettivo coinvolge sempre un numero variabile di sequenze ripetute terminali, dando origine ad episomi di dimensioni diverse nelle varie cellule infettate dal virus. Poiché gli episomi di EBV vengono mantenuti inalterati nella progenie di ciascuna cellula infettata, la dimensione delle sequenze terminali fuse del genoma virale costituisce un marcatore di clonalità costante per il virus e, conseguentemente, anche per la cellula che lo alberga (66) (figura 1).

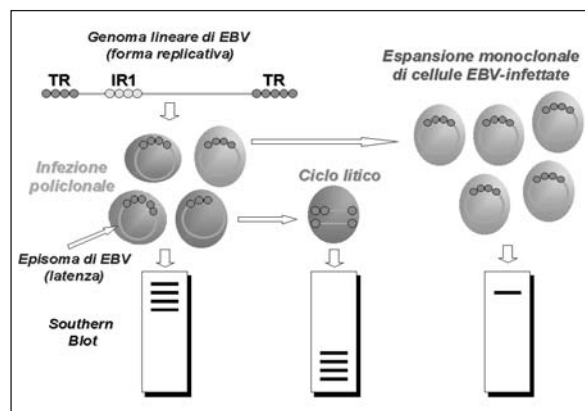


Figura 1. Determinazione della clonalità di EBV tramite l'analisi della configurazione molecolare e delle dimensioni delle estremità del genoma del virus. TR: sequenze ripetute terminali presenti alle estremità del genoma di EBV. IR1: dominio di sequenze ripetute interne al genoma virale.

Le indagini serologiche rivestono un valore limitato per quanto riguarda la diagnosi di PTLD, potendo essere addirittura confondenti a causa delle profonde alterazioni della risposta immune che si riscontrano in questi pazienti. L'importanza clinica della serologia sembra attualmente confinata alla identificazione di una sieronegatività per EBV pre-trapianto e, in tali casi, al riscontro di IgM specifiche per gli antigeni virocapsidici del virus quale evidenza di infezione primaria di EBV, condizioni associate ad un elevato rischio di sviluppare il PTLD. In pazienti EBV-sieropositivi all'epoca del trapianto, i titoli degli anticorpi contro antigeni di EBV sono spesso abnormemente elevati anche se tali alterazioni riflettono probabilmente i livelli di immunosoppressione più che essere indicativi della presenza di un PTLD.

Patogenesi dei PTLD

Globalmente i PTLD si riscontrano in circa l'1-10% di tutti i pazienti trapiantati e costituiscono il più frequente tipo di neoplasia dei bambini che hanno subito un trapianto (58). L'incidenza del PTLD varia considerevolmente a seconda del tipo di organo trapiantato, essendo più frequente in pazienti che hanno ricevuto un trapianto di intestino e di cuore/polmoni e molto bassa dopo tra-

pianto di midollo osseo autologo (58). Tali variazioni probabilmente rispecchiano il diverso carico di immunosoppressione farmacologica a cui vengono sottoposti i pazienti in funzione del tipo di trapianto effettuato. Un elevato rischio di PTLD (24%) si riscontra anche in pazienti che hanno ricevuto un midollo osseo allogenico depleto di linfociti T. In questi casi la profonda immunodepressione iatrogena si associa alla pressochè totale assenza di linfociti T sia del donatore che del ricevente, incrementando in tal modo la probabilità di sviluppare il PTLD. In pazienti che hanno ricevuto un trapianto di midollo osseo i PTLD derivano generalmente dai linfociti B del donatore, mentre la maggioranza dei PTLD insorti in accettori di trapianto d'organo sono di derivazione dai linfociti B del ricevente (58,77). Più della metà dei casi di PTLD è associata all'infezione primaria da parte di EBV e ciò spiega come la sieronegatività per EBV sia un importante fattore di rischio di PTLD nell'età pediatrica (31,63). La trasmissione dell'EBV ad un paziente trapiantato EBV-sieronegativo può avvenire tramite le modalità convenzionali o, più frequentemente, in seguito al trapianto di un organo contenente cellule EBV-infettate. In tali situazioni, la mancanza di risposte immuni efficaci contro EBV favorisce una incontrollata attività replicativa del virus che si traduce nell'infezione di un elevato numero di linfociti B che possono andare incontro alla trasformazione e proliferare indebitamente. La malattia in questi pazienti si manifesta generalmente entro il primo anno dal trapianto con un quadro clinico simile a quello della mononucleosi infettiva. Al contrario, la maggior parte dei PTLD dei pazienti EBV-sieropositivi al momento del trapianto insorge più tardivamente, talvolta anche a diversi anni di distanza dal trapianto (31). L'importanza delle alterazioni delle risposte immuni T cellulari EBV-specifiche nella patogenesi dei PTLD è sottolineata anche dai fattori di rischio che oggi sappiamo favorire lo sviluppo di tali disordini. Per i pazienti che hanno ricevuto un trapianto d'organo, questi fattori comprendono: la sieronegatività per EBV (in particolare in presenza di un donatore EBV-sieropositivo), lo sviluppo di un'infezione primaria da EBV (o riattivazioni occasionali del virus), elevati livelli di immunosoppressione farmacologica, presenza di malattia da citomegalovirus (CMV) e la giovane età, indipendentemente dalla sieropositività per EBV (57,58). Per quanto riguarda la malattia da CMV, questa potrebbe semplicemente riflettere l'entità dell'immunosoppressione, ma è anche possibile che la riattivazione del CMV abbia profondi effetti sul sistema immune dell'ospite, favorendo tra l'altro la produzione di citochine che potrebbero

transattivare direttamente geni di EBV (1). Le evidenze finora ottenute indicano comunque che, oltre all'immunosoppressione, altri fattori sono necessari per lo sviluppo dei PTLD (figura II).

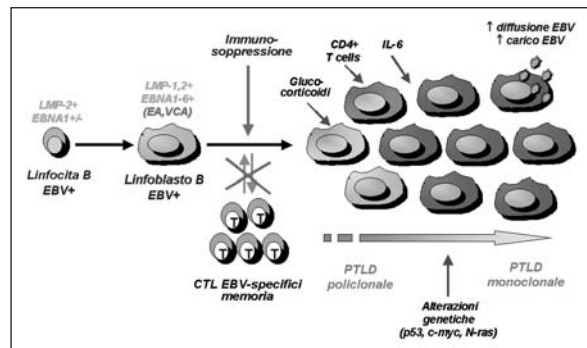


Figura II. Fattori associati allo sviluppo e alla progressione maligna dei PTLD.

Tra questi sembrano di rilevanza patogenetica alcuni fattori microambientali, quali la presenza di un'abbondante infiltrazione di linfociti T CD4+ che si riscontra frequentemente nelle lesioni di PTLD, particolarmente delle forme ad insorgenza precoce (64). In particolare, esperimenti condotti in topi immunodeficienti (SCID) hanno consentito di dimostrare che la presenza di linfociti T CD4+ è necessaria per lo sviluppo dei tumori simili al PTLD che si originano in seguito all'incolo di cellule mononucleate del sangue periferico derivate da individui EBV-sieropositivi (88). In tale modello animale è stato inoltre osservato che le cellule linfomatose producono citochine capaci di stimolare la proliferazione delle cellule B in modo autocrino (39). Tra le varie citochine in grado di contribuire allo sviluppo dei PTLD, l'IL-6 riveste certamente un ruolo rilevante. Infatti, livelli elevati di IL-6 nel siero di pazienti immunocompromessi sono stati correlati con un maggior rischio di sviluppare linfomi a cellule B (8). Inoltre, la neutralizzazione dell'IL-6 endogena tramite somministrazione di anticorpi specifici per IL-6 ha indotto stabilizzazione o parziale remissione del PTLD (27). Recentemente è stato inoltre dimostrato come concentrazioni fisiologiche di glucocorticoidi, ma non altri ormoni steroidei, promuovano direttamente la proliferazione di cellule B immortalizzate da EBV *in vitro* (65). Tali effetti sono efficientemente revertiti dal trattamento con mifepristone, un antagonista dei recettori dei glucocorticoidi. Tale composto, inoltre, si è dimostrato attivo anche *in vivo*, inibendo significativamente la crescita di linfociti B EBV+ in modelli animali, suggerendo un possibile contributo degli ormoni glucocorticoidi nella patogenesi dei PTLD (65). Infine, alterazioni genetiche, in particolare a carico dei geni p53, c-myc e N-ras, sono state associate all'evoluzione di forme

Tabella 1. Caratteristiche genotipiche, virologiche e cliniche dei PTLD

Categoria	Riarrangiamenti Ig	Clonalità EBV	Alterazioni genetiche	Caratteristiche cliniche
Iperplasia Plasmacitica	Generalmente policlonale	Raramente clonale	Nessuna	Regressione
PTLD Polimorfi	Generalmente monoclonale	Generalmente monoclonale	Nessuna	Regressione o Risoluzione con chirurgia, CT, RT
Linfoma Maligno	Sempre monoclonale	Sempre monoclonale	Presenti	Malattia aggressiva Prognosi infausta

policlonali di PTLD verso quadri francamente monoclonali ed altamente aggressivi (13,43).

Nella maggior parte dei casi le cellule del PTLD esprimono un pattern di latenza virale che comprende tutti gli antigeni della fase latente (latenza III), mentre si ritiene che solo una piccola proporzione di tali cellule presenti caratteristiche fenotipiche compatibili con una replicazione di EBV (67,84). Dato che l'espressione di alcuni oncogeni virali quali LMP-1 ed EBNA-2 è in grado di promuovere direttamente la proliferazione dei linfociti B, ciò spiega come l'EBV rivesta un ruolo diretto nella patogenesi del PTLD. Tuttavia, occorre sottolineare come l'espressione dei vari antigeni di EBV sia spesso eterogenea nell'ambito dello stesso caso, non essendo infrequente il riscontro di sottopopolazioni di cellule con pattern di latenza più ristretti (latenza I o II) (12,33,61,67). In tali casi, è probabile che siano intervenute alterazioni genetiche o epigenetiche in grado di rendere non più necessaria l'espressione di oncogeni virali per il mantenimento del fenotipo trasformato.

Monitoraggio del carico del DNA di EBV nel paziente trapiantato: aspetti metodologici e significato clinico

Una precoce identificazione dei pazienti a rischio di sviluppare PTLD è di cruciale importanza per ridurre la morbilità e la mortalità legate al PTLD. A tale proposito era stato ipotizzato che il monitoraggio del carico del DNA di EBV nel sangue periferico di pazienti trapiantati potesse rivestire rilevanza diagnostica, quale potenziale indicatore delle alterazioni immunopatologiche precedenti o associate allo sviluppo del PTLD. Tale ipotesi è stata ampiamente confermata da studi che hanno dimostrato come la presenza di PTLD sia significativamente associata ad elevate quantità del DNA di EBV nel sangue periferico, ciò sia in pazienti con trapianto di midollo osseo allogenico che in accettori di trapianto d'organo (25,41,69,70,75). Sebbene la valutazione del carico del DNA di EBV sia ancora frequentemente effettuata utilizzando tecniche semiquantitative, i dati più recenti sottolineano l'importanza dell'adozione di metodiche di PCR quantitativa basate sulla co-amplificazione del DNA di EBV insieme a concentrazioni note di uno standard interno

(6,73,80). In tali metodiche, ogni reazione risulta nella formazione di due diversi prodotti che possono essere distinti sulla base della lunghezza del frammento amplificato (6,73) o in seguito ad ibridazione con specifici oligonucleotidi (75,80). L'inclusione degli standard interni di calibrazione consente di normalizzare ogni reazione, indipendentemente dalla presenza di inibitori della PCR, dall'efficienza di amplificazione o dalla metodica usata per la purificazione del DNA. I prodotti della PCR possono poi essere quantificati grazie all'utilizzo di metodiche immunoenzimatiche (56,80), di analisi densitometriche dei frammenti separati su gel di agarosio (6) o mediante valutazione delle intensità del segnale ottenuto in seguito ad ibridazione con sonde radioattive (73). Sebbene siano accurati e riproducibili, tali approcci si sono rivelati notevolmente impegnativi e laboriosi. Metodiche di più recente generazione, quali la "real-time" PCR, hanno consentito di superare le limitazioni della PCR quantitativa, dimostrandosi molto utili per una rapida e diretta quantificazione dei prodotti di PCR. Le esperienze fin qui acquisite sull'uso della "real-time" PCR per la quantificazione del DNA di EBV in pazienti trapiantati hanno dimostrato come tale approccio sia estremamente valido per l'effettuazione di un monitoraggio frequente e su ampia scala delle dinamiche del carico del DNA di EBV in tali pazienti (74,82,87). Occorre tuttavia considerare che le metodiche di "real-time" PCR prevedono l'analisi comparativa dell'intensità di fluorescenza di un campione clinico con quella data da diluizioni seriali di un DNA di controllo presenti in tubi diversi da quello del campione in esame. Conseguentemente, le reazioni non sono normalizzate come nel caso della presenza di standard interni, e possono essere influenzate dalla presenza di inibitori della PCR o da variazioni dell'efficienza di amplificazione tra tubi diversi dello stesso esperimento, tra campioni di pazienti diversi o tra campioni seriali prelevati dallo stesso paziente (82). È stato pertanto proposto che l'accuratezza e la riproducibilità della metodica vengano opportunamente monitorate e validate usando quantità note di DNA di EBV e valutando attentamente le possibili variabili legate alla natura del campione biologico e i fattori capaci di

influenzare l'efficienza di amplificazione (82). L'incremento del carico del DNA di EBV che si riscontra nel sangue periferico dei pazienti trapiantati è generalmente considerato come indicatore di un aumentato numero di cellule EBV+ circolanti. In questi pazienti, l'aumento del numero di cellule EBV+ potrebbe derivare dalla proliferazione nei linfonodi di linfoblasti EBV-infettati preesistenti. Alternativamente, ciò potrebbe essere la conseguenza dell'aumentata produzione di virioni infettanti, favorita dall'immunosoppressione, che risulterebbe nella neo infezione di cellule B vergini. Queste si accumulerebbero progressivamente nel paziente come cellule B memoria a conclusione dell'iter differenziativo fisiologico che si realizza all'interno dei centri germinativi dei linfonodi (3-5). Recenti evidenze indicano che la maggior parte delle cellule EBV-infettate circolanti nei pazienti con PTLD e negli individui sani alberga meno di 50 copie di EBV/cellula. È stato inoltre dimostrato come la frequenza delle cellule EBV+ circolanti sia significativamente più elevata nei pazienti con PTLD rispetto a donatori sani EBV-sieropositivi (94). In tali studi, il carico virale era strettamente correlato con il numero di cellule EBV+, dimostrando che il numero di linfociti B EBV-infettati circolanti aumentava in ragione dei livelli di immunosoppressione piuttosto che riflettere un aumento del numero di genomi di EBV per singola cellula. Per quanto concerne il pattern di geni virali espressi dalle cellule EBV+ circolanti, le conoscenze attuali sono ancora limitate. Le evidenze disponibili sono coerenti con la possibilità che, dopo il trapianto, si passi dal pattern ristretto tipico degli individui sani a forme di latenza progressivamente più allargate fino ad arrivare alla latenza III (32,94). È importante sottolineare come tale forma di latenza, comprendente tutti gli EBNA ed LMP-1 e -2, non si riscontri unicamente in pazienti con PTLD, potendosi evidenziare anche in soggetti trapiantati senza linfoproliferazione ma sottoposti ad elevati carichi immunosoppressivi. Oltre all'espressione di geni della fase latente, le cellule EBV+ circolanti dei pazienti con PTLD conclamato mostrano frequentemente anche evidenze di attiva replicazione virale (espressione di gp350) (32), confermando l'ipotesi secondo la quale l'aumentato carico di EBV nel sangue periferico di questi pazienti possa essere dovuto anche all'ampliamento del pool di cellule neo infettate dal virus. Alcuni studi hanno riportato la presenza di elevati livelli di DNA di EBV anche nel plasma/siero di pazienti trapiantati (7,87), anche se l'origine di tale DNA rimane ancora poco chiara. Considerando che una piccola frazione di cellule di PTLD può mostrare segni di replicazione vira-

le (61,67), il DNA di EBV presente nel plasma/siero potrebbe essere dovuto alla presenza di virioni di EBV. Alternativamente, tale riscontro potrebbe rappresentare DNA virale rilasciato da cellule EBV+ danneggiate *in vivo* o *ex vivo* in seguito alla manipolazione del prelievo di sangue. Le discrepanze dei risultati riportati da studi condotti su plasma o siero (7,87) rispetto a quelli in cui è stata valutata soltanto la quantità di EBV associata alle cellule (72,81,94) potrebbero essere quindi motivate da differenze nella preparazione del campione biologico. Tuttavia, anche altri fattori potrebbero essere implicati, quali ad esempio differenze nell'intensità, durata e tipo di terapia immunosoppressiva o antivirale erogata, o situazioni legate ai diversi meccanismi patogenetici responsabili dello sviluppo del PTLD in pazienti sottoposti a diversi tipi di trapianto. Appare comunque evidente la necessità di superare tali discrepanze definendo quale sia il materiale biologico più idoneo da cui partire per effettuare l'indagine. Ciò consentirebbe di effettuare un importante passo in avanti verso la standardizzazione delle metodiche di quantificazione del carico di EBV. Le esperienze condotte finora suggeriscono come l'utilizzo di sangue intero possa presentare numerosi vantaggi rispetto a plasma, siero o cellule mononucleate circolanti purificate (81). Infatti, l'analisi richiederebbe soltanto piccole quantità di sangue (<100 µl), situazione molto favorevole per l'esecuzione di un frequente monitoraggio in bambini o in pazienti defedati. Inoltre, il sangue intero è un campione uniforme che comprende tutti i possibili compartimenti che possono contenere il DNA di EBV, consentendo analisi comparative di dati ottenuti in diverse Istituzioni. Infine, la determinazione del carico di EBV per millilitro di sangue intero dà una stima assoluta della quantità di DNA di EBV presente nel campione, indipendentemente da fluttuazioni nel numero di cellule, da possibili fenomeni di lisi cellulare e da perdita di cellule durante le procedure di separazione cellulare.

Nonostante l'ampia varietà di metodiche impiegate, di campioni biologici utilizzati e di gruppi di pazienti analizzati, tutti gli studi finora condotti sono concordi nel concludere che i pazienti con PTLD hanno una quantità di DNA di EBV circolante significativamente più elevata rispetto a donatori sani EBV-sieropositivi o a pazienti trapiantati senza PTLD. Ciò che resta da definire è un valore soglia che consenta di identificare pazienti ad elevato rischio di sviluppare PTLD. Dato che si è ancora abbastanza lontani dalla definizione di valori di riferimento validi a livello internazionale, ciò che conta attualmente è l'esperienza maturata a livello dei singoli Centri che uti-

lizzano propri valori soglia di significato clinico, definiti dall'utilizzo delle metodiche di indagine applicate localmente a specifici gruppi di pazienti trapiantati. La rilevanza della definizione di tali valori soglia risiede nella necessità di disporre di parametri laboratoristici che, complementando il quadro clinico, aiutino il medico a stabilire quando è il caso di ridurre il carico di farmaci immunosoppressori o quando è opportuno iniziare terapie tese a prevenire lo sviluppo del PTLD, utilizzando farmaci antivirali, anticorpi monoclonali anti-CD20 (rituximab), o infusioni di linfociti T citotossici EBV-specifici autologhi (51,62,70,71,94). Un accurato monitoraggio del carico di EBV si è inoltre rivelato utile per valutare la risposta alle terapie effettuate, consentendo un'opportuna modulazione a livello del singolo paziente (51,62). Tuttavia, elevati carichi di EBV non sempre sono indicativi dello sviluppo di PTLD, mentre tali linfoproliferazioni possono insorgere anche in assenza di un concomitante incremento della quantità del DNA di EBV circolante (51,52,62,78,86). Ciò indica che la sola determinazione del carico di EBV non è sufficiente a predire il rischio di PTLD. Dati recenti suggeriscono come la determinazione del numero dei linfociti T EBV-specifici circolanti, effettuata mediante la tecnica ELISPOT, possa incrementare significativamente il potere predittivo del solo carico di EBV (78). In particolare, è stato dimostrato che, nell'ambito di pazienti trapiantati di fegato che sono andati incontro ad infezione primaria da EBV, il PTLD è insorto soltanto in quelli che mostravano sia carichi elevati di EBV che un basso numero di linfociti T EBV-specifici circolanti ($< 2/\text{mm}^3$) (78).

Prospettive future

Sebbene il PTLD sia da considerarsi un disordine linfoproliferativo relativamente raro, il progressivo aumento di tutti i tipi di trapianto e l'elevata mortalità associata alla malattia giustificano il notevole interesse all'approfondimento dei meccanismi patogenetici alla base dello sviluppo del PTLD e stimolano ulteriori studi tesi a migliorare la gestione clinica di questi pazienti. In particolare, la recente dimostrazione che diverse proteine di EBV sono in grado di deregolare vie di trasduzione del segnale cruciali per un normale funzionamento dei linfociti B potrà consentire di disegnare terapie più mirate e gravate da minori effetti tossici. Il monitoraggio del carico di EBV nei pazienti trapiantati si è dimostrato un supporto molto utile ai fini predittivi e diagnostici, migliorando notevolmente la gestione clinica. Tuttavia, molto rimane ancora da fare in termini di standardizzazione delle metodiche di indagine utilizzate, ed in particolare per ciò che riguarda la

tipologia e la quantità del materiale biologico di partenza, l'identificazione di standard quantitativi di riferimento e la definizione di valori soglia di significato clinico. Appare comunque evidente come sia necessario integrare la quantificazione del carico di EBV con altri parametri, prevalentemente di natura immunologica, al fine di poter meglio valutare l'equilibrio dinamico esistente tra l'EBV e il sistema immune dell'ospite trapiantato. Ciò consentirà di definire con maggior precisione tempi, tipologie e modalità degli interventi terapeutici a livello del singolo paziente, particolarmente di quelli che prevedono l'infusione di linfociti T citotossici EBV-specifici. I successi conseguiti da tali approcci di immunoterapia nel paziente trapiantato sono estremamente incoraggianti e costituiscono un bagaglio di esperienza che potrebbe essere molto utile anche per migliorare la terapia di altre malattie, sia di tipo neoplastico che ad eziologia virale. Occorre tuttavia ricordare che gli studi attualmente disponibili relativamente agli effetti dei vari tipi di terapia per il PTLD sono usualmente mono-istituzionali e comprendono numeri di pazienti molto limitati. Pertanto, per una migliore definizione dei protocolli terapeutici da adottare per il PTLD, sarebbe auspicabile la realizzazione di studi prospettici multi-istituzionali che utilizzino preferibilmente metodiche standardizzate per il monitoraggio virologico ed immunologico dei pazienti trapiantati.

Ringraziamenti

Il lavoro svolto presso l'Unità di Immunovirologia e Bioterapie e il Dipartimento della Ricerca Pre-Clinica ed Epidemiologica del CRO di Aviano è finanziato da grants della Comunità Europea (FP5, contratto QLK3-CT-2002-02029) e dell'Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro.

BIBLIOGRAFIA

1. Aalto SM, Linnavuori K, Peltola H, et al. Immunoreactivation of Epstein-Barr virus due to cytomegalovirus primary infection. *J Med Virol* 1998; 56: 186-91.
2. Babcock GJ, Decker LL, Volk M, Thorley-Lawson DA. EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* 1998; 9: 395-404.
3. Babcock GJ, Decker LL, Freeman RB, Thorley-Lawson DA. Epstein-barr virus-infected resting memory B cells, not proliferating lymphoblasts, accumulate in the peripheral blood of immunosuppressed patients. *J Exp Med* 1999; 190: 567-76.
4. Babcock GJ, Hochberg D, Thorley-Lawson AD. The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell. *Immunity* 2000; 13: 497-506.
5. Babcock GJ, Thorley-Lawson DA. Tonsillar memory B cells, latently infected with Epstein-Barr virus, express the restricted pattern of latent genes previously found

- only in Epstein-Barr virus-associated tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 12250-5.
6. Baldanti F, Grossi P, Furione M, et al. High levels of Epstein-Barr virus DNA in blood of solid-organ transplant recipients and their value in predicting posttransplant lymphoproliferative disorders. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 613-9.
 7. Barkholt LM, Dahl H, Enbom M, Linde A. Epstein-Barr virus DNA in serum after liver transplantation—surveillance of viral activity during treatment with different immunosuppressive agents. *Transpl Int* 1996; 9: 439-45.
 8. Breen EC, van der Meijden M, Cumberland W, Kishimoto T, Detels R, Martinez-Maza O. The development of AIDS-associated Burkitt's/small noncleaved cell lymphoma is preceded by elevated serum levels of interleukin 6. *Clin Immunol* 1999; 92:293-9.
 9. Brennan P, Mehl AM, Jones M, Rowe M. Phosphatidylinositol 3-kinase is essential for the proliferation of lymphoblastoid cells. *Oncogene* 2002; 21: 1263-71.
 10. Caldwell RG, Brown RC, Longnecker R. Epstein-Barr virus LMP2A-induced B-cell survival in two unique classes of EmuLMP2A transgenic mice. *J Virol* 2000; 74: 1101-13.
 11. Calender A, Billaud M, Aubry JP, Banchereau J, Vuillaume M, Lenoir GM. Epstein-Barr virus (EBV) induces expression of B-cell activation markers on *in vitro* infection of EBV-negative B-lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 8060-4.
 12. Cen H, Williams PA, McWilliams HP, Breinig MC, Ho M, McKnight JL. Evidence for restricted Epstein-Barr virus latent gene expression and anti-EBNA antibody response in solid organ transplant recipients with post-transplant lymphoproliferative disorders. *Blood*. 1993; 81: 1393-403.
 13. Chadburn A, Chen JM, Hsu DT, et al. The morphologic and molecular genetic categories of posttransplantation lymphoproliferative disorders are clinically relevant. *Cancer* 1998; 82: 1978-87.
 14. Chen F, Zou JZ, di Renzo L, et al. A subpopulation of normal B cells latently infected with Epstein-Barr virus resembles Burkitt lymphoma cells in expressing EBNA-1 but not EBNA-2 or LMP1. *J Virol* 1995; 69: 3752-8.
 15. Dawson CW, Rickinson AB, Young LS. Epstein-Barr virus latent membrane protein inhibits human epithelial cell differentiation. *Nature* 1990; 344: 777-80.
 16. Dolcetti R, Masucci MG. Epstein-Barr virus: induction and control of cell transformation. *J Cell Physiol* 2003; 196: 207-18.
 17. Dolcetti R, Menezes J. Epstein-Barr virus and undifferentiated nasopharyngeal carcinoma: new immunobiological and molecular insights on a long-standing etiopathogenic association. *Adv Cancer Res* 2003; 87: 127-57.
 18. Eliopoulos AG, Young LS. LMP1 structure and signal transduction. *Semin Cancer Biol* 2001; 11: 435-44.
 19. Fahraeus R, Rymo L, Rhim JS, Klein G. Morphological transformation of human keratinocytes expressing the LMP gene of Epstein-Barr virus. *Nature* 1990; 345: 447-9.
 20. Falk K, Gratama JW, Rowe M, et al. The role of repetitive DNA sequences in the size variation of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigens, and the identification of different EBV isolates using RFLP and PCR analysis. *J Gen Virol* 1995; 76: 779-90.
 21. Faulkner GC, Burrows SR, Khanna R, Moss DJ, Bird AG, Crawford DH. X-Linked agammaglobulinemia patients are not infected with Epstein-Barr virus: implications for the biology of the virus. *J. Virol* 1999; 73: 1555-64.
 22. Fingerroth JD, Weis JJ, Tedder TF, Strominger JL, Biro PA, Fearon DT. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 4510-4.
 23. Gaidano G, Capello D, Carbone A. The molecular basis of acquired immunodeficiency syndrome-related lymphomagenesis. *Semin Oncol* 2000; 27: 431-41.
 24. Gratama JW, Oosterveer MA, Zwaan FE, Lepoutre J, Klein G, Ernberg I. Eradication of Epstein-Barr virus by allogeneic bone marrow transplantation: implications for sites of viral latency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 8693-6.
 25. Green M, Cacciarelli TV, Mazariegos GV, et al. Serial measurement of Epstein-Barr viral load in peripheral blood in pediatric liver transplant recipients during treatment for posttransplant lymphoproliferative disease. *Transplantation* 1998; 66: 1641-4.
 26. Greenspan JS, Greenspan D, Lennette ET, et al. Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral "hairy" leukoplakia, an AIDS-associated lesion. *N Engl J Med* 1985; 313: 1564-71.
 27. Haddad E, Paczesny S, Leblond V, et al. Treatment of B-lymphoproliferative disorder with a monoclonal anti-interleukin-6 antibody in 12 patients: a multicenter phase 1-2 clinical trial. *Blood* 2001; 97: 1590-7.
 28. Harris NL, Ferry JA, Swerdlow SH. Posttransplant lymphoproliferative disorders: summary of Society for Hematopathology Workshop. *Semin Diagn Pathol* 1997; 14: 8-14.
 29. Hecht JL, Aster JC. Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3707-21.
 30. Henderson S, Rowe M, Gregory C, et al. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* 1991; 65: 1107-15.
 31. Ho M, Miller G, Atchison RW, et al. Epstein-Barr virus infections and DNA hybridization studies in posttransplantation lymphoma and lymphoproliferative lesions: the role of primary infection. *J Infect Dis* 1985; 152: 876-86.
 32. Hopwood PA, Brooks L, Parratt R, et al. Persistent Epstein-Barr virus infection: unrestricted latent and lytic viral gene expression in healthy immunosuppressed transplant recipients. *Transplantation* 2002; 74: 194-202.
 33. Hunt BJ, Thomas JA, Burke M, Walker H, Yacoub M, Crawford DH. Epstein-Barr virus associated Burkitt lymphoma in a heart transplant recipient. *Transplantation* 1996; 62: 869-72.
 34. Iezzoni JC, Gaffey MJ, Weiss LM. The role of Epstein-Barr virus in lymphoepithelioma-like carcinomas. *Am J Clin Pathol* 1995; 103: 308-15.
 35. Ikeda M, Ikeda A, Longan LC, Longnecker R. The Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A PY motif recruits WW domain-containing ubiquitin-protein ligases. *Virology* 2000; 268: 178-91.
 36. International Agency for Research on Cancer. Epstein-Barr Virus and Kaposi's Sarcoma Herpesvirus/Human Herpesvirus 8. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol.70, Lyon, France: WHO 1997.
 37. Jansson A, Masucci M, Rymo L. Methylation of discrete sites within the enhancer region regulates the activity of the Epstein-Barr virus BamHI W promoter in Burkitt lymphoma lines. *J Virol* 1992; 66: 62-9.
 38. Jenson HB, Leach CT, McClain KL, et al. Benign and malignant smooth muscle tumors containing Epstein-Barr virus in children with AIDS. *Leuk Lymphoma* 1997; 27: 303-14.
 39. Johannessen I, Asghar M, Crawford DH. Essential role for T cells in human B-cell lymphoproliferative disease development in severe combined immunodeficient mice.

- Br J Haematol 2000; 109:600-10.
40. Kaye KM, Izumi KM, Kieff E. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 9150-4.
 41. Kenagy DN, Schlesinger Y, Weck K, Ritter JH, Gaudreault-Keener MM, Storch GA. Epstein-Barr virus DNA in peripheral blood leukocytes of patients with posttransplant lymphoproliferative disease. *Transplantation* 1995; 60: 547-54.
 42. Knowles DM. The molecular genetics of post-transplantation lymphoproliferative disorders. *Springer Semin Immunopathol* 1998; 20: 357-73.
 43. Knowles DM. Immunodeficiency-associated lymphoproliferative disorders. *Mod Pathol* 1999; 12: 200-17.
 44. Kulwicht W, Edwards RH, Davenport EM, Baskar JF, Godfrey V, Raab-Traub N. Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 11963-8.
 45. Laherty CD, Hu HM, Opiari AW, Wang F, Dixit VM. The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B. *J Biol Chem* 1992; 267: 24157-60.
 46. Lam N, Sugden B. CD40 and its viral mimic, LMP1: similar means to different ends. *Cell Signal* 2003; 15: 9-16.
 47. Leight ER, Sugden B. EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus. *Rev Med Virol* 2000; 10: 83-100.
 48. Levitskaya J, Coram M, Levitsky V, et al. Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* 1995; 375: 685-8.
 49. Longnecker R, Miller CL, Miao XQ, Marchini A, Kieff E. The only domain which distinguishes Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A (LMP2A) from LMP2B is dispensable for lymphocyte infection and growth transformation in vitro; LMP2A is therefore non-essential. *J Virol* 1992; 66: 6461-9.
 50. Longnecker R. Epstein-Barr virus latency: LMP2, a regulator or means for Epstein-Barr virus persistence? *Adv Cancer Res* 2000; 79: 175-200.
 51. Loren AW, Porter DL, Stadtmauer EA, Tsai DE. Post-transplant lymphoproliferative disorder: a review. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31: 145-55.
 52. Lucas KG, Burton RL, Zimmerman SE, et al. Semiquantitative Epstein-Barr virus (EBV) polymerase chain reaction for the determination of patients at risk for EBV-induced lymphoproliferative disease after stem cell transplantation. *Blood* 1998; 91: 3654-61.
 53. Masucci MG, Contreras-Salazar B, Ragnar E, et al. 5-Azacytidine up regulates the expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA-2) through EBNA-6 and latent membrane protein in the Burkitt's lymphoma line rael. *J Virol* 1989; 63: 3135-41.
 54. Miyashita EM, Yang B, Babcock GJ, Thorley-Lawson DA. Identification of the site of Epstein-Barr virus persistence *in vivo* as a resting B cell. *J Virol* 1997; 71: 4882-91.
 55. Moorthy RK, Thorley-Lawson DA. All three domains of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein LMP-1 are required for transformation of rat-1 fibroblasts. *J Virol* 1993; 67: 1638-46.
 56. Mutimer D, Kaur N, Tang H, et al. Quantitation of Epstein-Barr virus DNA in the blood of adult liver transplant recipients. *Transplantation* 2000; 69: 954-9.
 57. Nalesnik MA. Posttransplantation lymphoproliferative disorders (PTLD): current perspectives. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 8: 139-48.
 58. Nalesnik MA. Clinical and pathological features of post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD). *Springer Semin Immunopathol* 1998; 20: 325-42.
 59. Niedobitek G, Agathangelou A, Herbst H, Whitehead L, Wright DH, Young LS. Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells. *J Pathol* 1997; 182: 151-9.
 60. Osborne B, Miele L. Notch and the immune system. *Immunity* 1999; 11: 653-63.
 61. Oudejans JJ, Jiwa M, van den Brule AJ, et al. Detection of heterogeneous Epstein-Barr virus gene expression patterns within individual post-transplantation lymphoproliferative disorders. *Am J Pathol* 1995; 147: 923-33.
 62. Paya CV, Fung JJ, Nalesnik MA, et al. Epstein-Barr virus-induced posttransplant lymphoproliferative disorders. ASTS/ASTP EBV-PTLD Task Force and The Mayo Clinic Organized International Consensus Development Meeting. *Transplantation* 1999; 68: 1517-25.
 63. Penn I. De novo malignancies in pediatric organ transplant recipients. *Pediatr Transplant* 1998; 2: 56-63.
 64. Perera SM, Thomas JA, Burke M, Crawford DH. Analysis of the T-cell micro-environment in Epstein-Barr virus-related post-transplantation B lymphoproliferative disease. *J Pathol* 1998; 184: 177-84.
 65. Quaiia M, Zancai P, Cariati R, Rizzo S, Boiocchi M, Dolcetti R. Glucocorticoids promote the proliferation and antagonize the retinoic acid-mediated growth suppression of Epstein-Barr virus-immortalized B lymphocytes. *Blood* 2000; 96: 711-8.
 66. Raab-Traub N, Flynn K. The structure of the termini of the Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation. *Cell* 1986; 47: 883-9.
 67. Rea D, Fourcade C, Leblond V, et al. Patterns of Epstein-Barr virus latent and replicative gene expression in Epstein-Barr virus B cell lymphoproliferative disorders after organ transplantation. *Transplantation* 1994; 58: 317-24.
 68. Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996; 2397-446.
 69. Riddler SA, Breinig MC, McKnight JL. Increased levels of circulating Epstein-Barr virus (EBV)-infected lymphocytes and decreased EBV nuclear antigen antibody responses are associated with the development of posttransplant lymphoproliferative disease in solid-organ transplant recipients. *Blood* 1994; 84: 972-84.
 70. Rooney CM, Loftin SK, Holladay MS, Brenner MK, Krance RA, Heslop HE. Early identification of Epstein-Barr virus-associated post-transplantation lymphoproliferative disease. *Br J Haematol* 1995; 89: 98-103.
 71. Rooney CM, Smith CA, Ng CY, et al. Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* 1998; 92: 1549-55.
 72. Rose C, Green M, Webber S, Ellis D, Reyes J, Rowe D. Pediatric solid-organ transplant recipients carry chronic loads of Epstein-Barr virus exclusively in the immunoglobulin D-negative B-cell compartment. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1407-15.
 73. Rowe DT, Qu L, Reyes J, et al. Use of quantitative competitive PCR to measure Epstein-Barr virus genome load in the peripheral blood of pediatric transplant patients with lymphoproliferative disorders. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1612-5.
 74. Rowe DT, Webber S, Schauer EM, Reyes J, Green M. Epstein-Barr virus load monitoring: its role in the prevention and management of post-transplant lymphoproliferative disease. *Transpl Infect Dis* 2001; 3: 79-87.
 75. Savoie A, Perpete C, Carpentier L, Joncas J, Alfieri C.