
ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015
УДК 616-006.04-022:578.825.13]-7

Гончарова Е.В., Сеньюта Н.Б., Смирнова К.В., Щербак Л.Н., Гурцевич В.Э.

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) в России: инфицированность населения и анализ вариантов гена *LMP1* у больных ВЭБ-ассоциированными патологиями и здоровых лиц

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАН, 115478, г. Москва

Широко распространенный среди населения планеты вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) является этиологическим агентом для ряда злокачественных новообразований человека. Один из кодируемых вирусом онкобелков, латентный мембранный белок 1 (*LMP1*), через активацию комплекса сигнальных путей участвует в процессах immortalization и трансформации клеток. Целью настоящего исследования стало изучение инфицированности ВЭБ российской популяции и анализ полиморфизма *LMP1* у больных с доброкачественными и злокачественными ВЭБ-ассоциированными заболеваниями и здоровых вирусоносителей. Исследования показали, что процент инфицированных лиц к 5–9 годам достигает практически максимальных значений. При этом с возрастом титры вирусспецифических антител снижаются при высоком проценте инфицированных лиц и вновь повышаются в группах лиц пожилого возраста. Анализ нуклеотидных последовательностей гена *LMP1*, транслированных в аминокислотные последовательности, неожиданно выявил не только у здоровых лиц, но и у больных всеми формами ВЭБ-ассоциированных заболеваний доминирование низкодивергентного варианта B95.8/A. Высокодивергентные варианты Ch1 и Med+, содержащие делецию 10 аминокислот (а.к.), и характеризующиеся повышенной трансформирующей активностью, чаще обнаруживали в образцах опухолевой ткани, чем в образцах крови/смывов полости рта тех же больных. Обнаружение высокотрансформирующего варианта Ch1 в образцах крови здоровых лиц свидетельствует о том, что этот аналог китайского варианта Cao может персистировать в любой популяции и не обязательно связан с возникновением ВЭБ-ассоциированных патологий.

Ключевые слова: вирус Эпштейна–Барр; вирусспецифические антитела; латентный мембранный белок 1 (*LMP1*); полиморфизм *LMP1*.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60(2): 11–17.

Goncharova E.V., Senyuta N.B., Smirnova K.V., Shcherbak L.N., Gurtsevich V.E

Epstein-Barr virus (EBV) in Russia: infection of the population and analysis of the *LMP1* gene variants in patients with EBV-associated pathologies and healthy individuals

Federal State Budgetary Scientific Institution «N.N.Blokhin Cancer Research Center», 115478, Moscow, Russia

The Epstein–Barr virus, widespread herpesvirus among the population of the planet, is also the etiologic agent for a number of malignancies. One of the oncoproteins encoded by the virus, the latent membrane protein 1 (*LMP1*), through activation of the complex signaling pathways is involved in the processes of cell immortalization and transformation. The goal of this work was to study the level of the EBV infection in Russian population and *LMP1* polymorphism in patients with benign and malignant EBV-associated diseases and healthy virus carriers. Studies have shown that by the age of 5–9 years the percentage of the infected persons and the level of antibody titers reaches almost the maximum values. With the age, virus specific antibody titers are decreased (with a high percentage of infected persons) and increased again in groups of older persons. The analysis of the nucleotide sequences of the gene *LMP1* translated in amino acid (aa) sequences unexpectedly revealed the dominance a low divergent variant *LMP1* B95.8A not only in healthy individuals but also in patients with all forms of EBV-associated diseases. Highly divergent variants Ch1 and Med +, containing a deletion of 10 aa, and characterized by elevated transforming activity more often were detected in the tumor tissue samples than in the blood samples/mouth washes of the same patients. Detection of highly transforming variant *LMP1* Ch1 in blood samples of healthy individuals indicates that this analog of Chinese variant Cao may persist in any population and is not necessarily associated with the occurrence of the EBV-associated disorders.

Key words: Epstein-Barr virus; virus specific antibodies; latent membrane protein 1 (*LMP1*); *LMP1* polymorphism.

Citation: *Voprosy virusologii*. 2015; 60 (2): 11–17. (In Russ.)

For correspondence: Elena Goncharova, candidate of biological Sciences; e-mail: goncharova@dna-tech.ru

Введение

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ), относящийся к семейству *Herpesviridae*, подсемейству *Gammapherpesvirinae*, роду *Lymphocryptovirus*, обладает уникаль-

ными биологическими свойствами. Им инфицировано практически все население планеты, не вызывая у инфицированных лиц каких-либо клинических проявлений; ВЭБ – признанный этиологический

Для корреспонденции: Гончарова Елена Васильевна, канд. биол наук; e-mail: goncharova@dna-tech.ru

агент для ряда доброкачественных и злокачественных заболеваний. Еще одна особенность вируса состоит в географической и этнической избирательности проявления им своих онкогенных потенций. Так, наиболее высокая заболеваемость раком носоглотки отмечается в южных провинциях Китая и странах Юго-Восточной Азии, несколько реже – в арабских странах Северной Африки и на Аляске. Ассоциированные с ВЭБ случаи лимфомы Беркитта часто встречаются у детей в Экваториальной Африке и крайне редко – в других регионах мира. Что касается лимфомы Ходжкина, в различных странах уровни заболеваемости этой патологией не совпадают с уровнями ВЭБ-ассоциированных случаев болезни. Последние чаще всего регистрируют в Африке и Южной Америке и несколько реже в Европе, США и Китае [1]. В России встречаются различные типы ВЭБ-ассоциированных патологий, но они не носят эпидемический характер.

ВЭБ обладает геномом в виде двуцепочечной ДНК, состоящей приблизительно из 172 тысяч пар нуклеотидов, которые кодируют около 90 генов. Во время латентной инфекции у ВЭБ экспрессируется ограниченный набор генов, включая гены, кодирующие 2 неполиаденилированные РНК (EBER-1 и EBER-2), 6 ядерных белков (EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, -3B и -3C, лидерный белок (EBNA-LP), а также 3 интегральных мембранных белка (LMP-1, LMP-2A и -2B) [2]. В течение продуктивного цикла инфекции экспрессируется большое число предранних, ранних и поздних генов [1,3].

Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что один из генов латентной инфекции ВЭБ, латентный мембранный белок 1 (LMP1), принимает активное участие в развитии ВЭБ-ассоциированных заболеваний. Экспрессия этого гена приводит к трансформации клеток крысиных фибробластов и В-лимфоцитов человека *in vitro*, а у трансгенных мышей он играет ключевую роль в развитии лимфом [4, 5]. LMP1 часто экспрессирован в индуцированных ВЭБ неоплазиях, включая лимфому Ходжкина и рак носоглотки. Свойства LMP1 во многом определяются его высоким сходством с членами семейства рецепторов факторов некроза опухоли (TNRF1 и CD40), что позволяет ему через взаимодействие с различными клеточными молекулами и внутриклеточными сигнальными каскадами осуществлять трансформирующее и другие воздействия на клетку [6, 7]. В этот процесс вовлечены 3 трансактивирующие области LMP1, локализованные в его С-концевом цитоплазматическом домене (STAR1, STAR2 и STAR3). Подобно TNF-рецептору эти области взаимодействуют с клеточными адаптерными молекулами TRAF-2, -3, -5, -6 и TRADD, а также с рецептором, взаимодействующим с протеинкиназой RIP, BS69 и белками Янус-киназы, вызывая активацию различных транскрипционных факторов [8–10]. Кроме того, LMP1 вызывает активацию с-Jun N-терминальной киназы (AP-1), фосфоинозитол-3-киназы (PI3-K), канонического и неканонического путей активации транскрипционного ядерного фактора NF- κ B, а также приводит к индукции p42/p44 митогенактивируемой протеинкиназы (МАРК) сигнального пути и p38 МАРК. Показано, что LMP1 подавляет (как правило, опосредованно) экспрессию ряда ключевых опухолевых супрессоров (p53,

RASSF1A). Он также нарушает работу проверочных точек клеточного цикла G1-S, обеспечивая выживание поврежденных клеток, индуцирует экспрессию провоспалительных цитокинов, наделяет инфицированные клетки резистентностью к апоптозу, вызывает эпителиально-мезенхимальный переход (EMT), усиливает подвижность клеток, их инвазию и метастазирование, селективно подавляет либо активирует экспрессию ряда клеточных микро-РНК и т. д. [11–13]. Функциональной мультипотентностью, вероятно, и объясняется трансформирующая и онкогенная потенция LMP1, проявляемая им в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Молекулярный анализ образцов LMP1 различного географического происхождения, выявил его полиморфизм, часто отражающий его неодинаковую биологическую активность. Начало положил вариант LMP1 китайского происхождения Caо, в котором в отличие от прототипного варианта LMP1-B95.8 в С-терминальной области обнаружена делеция 10 аминокислот (а.к.), три 11-аминокислотных повтора и многочисленные точечные мутации [6]. Этот вариант обладает способностью трансформировать различные культуры клеток грызунов и оказался высокотуморогенным для мышей с выраженным комбинированным иммунодефицитом (SCID). Он также играет ключевую роль в иммортализации В-лимфоцитов и кератиноцитов человека *in vitro* [4, 14]. Высоко трансформирующие варианты LMP1, подобно китайскому варианту Caо, были также выделены от больных раком носоглотки (РНГ) на Тайване (C15) и в Средиземноморье (T510) [15,16].

Известно, что С-терминальная область LMP1 характеризуется варьирующим набором точечных мутаций, ведущих к замене отдельных аминокислот, образованием делеций, повторов и в случае конфекции двумя различными штаммами ВЭБ – гомологичными рекомбинациями [17]. Некоторые мутации С-терминального домена оказывают влияние на иммуногенность и время полужизни LMP1, усиливая его трансформирующее воздействие на клетку. Определенные мутации, локализованные в трансмембранном домене LMP1, приводят к значительному снижению цитотоксического действия этого белка на клетку, что, вероятно, влияет на его трансформирующий потенциал [8, 18, 19].

С целью систематизации вариантов LMP1 были предложены классификации, базирующиеся на совокупности ключевых а.к.-замен в С-терминальной области по отношению к той же области прототипного варианта LMP1-B95.8. Из наиболее известных классификаций следует назвать классификацию R. Edwards и соавт. [18], описавших наиболее типичные замены для отдельных областей мира, названия которых (Alaskan, China 1 (Ch1), China 2 (Ch2), China 3 (Ch3), Mediterranean + (Med+), Mediterranean - (Med-), New York City (NC)) отражают их географическое происхождение [18]. Известна также классификация D. Walling и соавт. [17], основанная на анализе числа а.к.-замен с каждой стороны от повтора 33 пар оснований (п.о.). При этом обнаружено, что по сравнению с LMP1 прототипного штамма B95.8 Caо-делецированные варианты LMP1 (LMP1-Caо, LMP1-1510) демонстрировали усиленную туморогенность и сниженную иммуногенность в различных тестах *in vivo* и *in vitro* [19–21]. Поскольку высокоту-

морогенные LMP1-Сао и LMP1-1510 содержат многочисленные мутации (делеции, аминокислотные замены и вставки), т. е. являются высокодивергентными, вполне справедливо было предположить, что некоторые из секвенсных вариаций в молекуле LMP1 формируют мутационные горячие точки, которые могут вносить свой вклад в ВЭБ-ассоциированный канцерогенез. В этом плане привлекают внимание варианты China 1 и Med+ (аналоги варианта Сао), обладающие делецией 10 а.к., с которой связывают их усиленный трансформирующий потенциал [8].

Каждый представитель из 6 перечисленных вариантов LMP1 был детально охарактеризован по его способностям трансформировать клетки млекопитающих (Rat-1), активировать целый спектр сигнальных путей, включая транскрипционный фактор NF- κ B, а также связывать один из клеточных белков из семейства E3-убиквитинлигаз (HOS/ β -TrCP) [22, 23]. При этом варианты с незначительным полиморфизмом (3-4 а.к. замены) по отношению к LMP1-B95.8, например, LMP1 B95.8/A по классификации D. Walling и соавт. [17], относят к низкодивергентным, а высоко полиморфные, т. е. варианты с большим числом а.к. замен, делеций и вставок – к высокодивергентным. К числу последних можно, вероятно, причислить все шесть указанных выше вариантов LMP1 по классификации R. Edwards и соавт., хотя варианты China 1 и Med+ благодаря содержащейся в них делеции 10 а.к. выделяются по своей трансформирующей и функциональной активности.

Целью настоящего исследования было изучение инфицированности ВЭБ российской популяции и анализ полиморфизма вирусного онкогена *LMP1* у больных доброкачественными и злокачественными ВЭБ-ассоциированными заболеваниями, а также у здоровых вирусносителей.

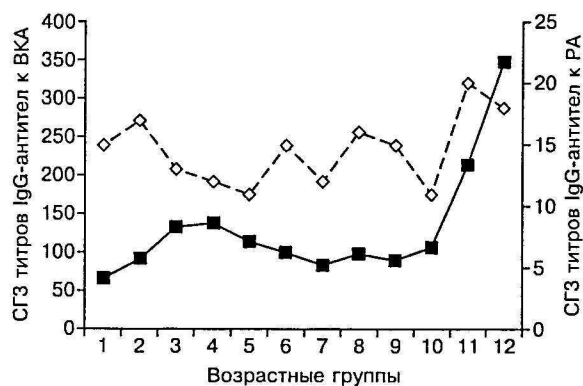
Материалы и методы

Группы больных и образцы ДНК

Объектом для изучения были образцы опухолевой ткани, лимфоцитов периферической крови, а также эпителиальных клеток смывов полости рта (ПР) от российских больных лимфомой Ходжкина (ЛХ) – 14 случаев, неходжкинскими лимфомами (НХЛ) – 12 случаев, РНГ – 23 случая, РЖ (рак желудка) – 12 случаев и инфекционным мононуклеозом (ИМ) – 10 случаев, а в качестве контроля образцы лимфоцитов периферической крови доноров крови/здоровых лиц (22 образца). Данное исследование, в которое указанные больные включены с их согласия в результате случайной выборки, было одобрено Комитетом по этике при ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

Экстракция ДНК и секвенсный анализ ПЦР-продуктов

Экстракция ДНК. Из собранного для исследования биологического материала ДНК выделяли методом фенол-хлороформной депротенинизации. Подтверждение наличия ДНК в выделенных образцах проводили методом Real Time PCR, используя следующую пару праймеров к области гена GAPDH: 5'-AGT CCA GTG AGC TTC CCG TTC AGC-3'; 5'-TGG TAT CGT GGA AGG ACT CAT GAC-3'. Для детекции продуктов амплификации использовали интеркалирующий краситель SYBR Green I (в разведении 1: 75,000) и после окончания ПЦР про-



Динамика титров антител к вирусу Эпштейна-Барр в различных возрастных группах населения России (на примере населения Москвы)

1 – 0–0,5 года (45); 2 – 0,6–2 года (16); 3 – 3–4 года (25); 4 – 5–9 лет (40); 5 – 10–14 лет (35); 6 – 15–19 лет (72); 7 – 20–24 года (95); 8 – 25–34 года (80); 9 – 35–44 года (66); 10 – 45–54 года (51); 11 – 55–69 лет (12); 12 – 70+ лет (49).

водили плавление продуктов амплификации. Амплификация была выполнена при следующем температурном режиме: денатурация при 94°C – 2 мин, затем 50 циклов: 94°C – 20 сек, 64°C – 20 сек, 72°C – 10 сек. Реакцию проводили в 96-луночных планшетах, используя iQ5 Real Time PCR detection system (“Bio-Rad Laboratories”, Калифорния, США).

Секвенсный анализ. Для удобства секвенирования ген *LMP1* из изучаемого материала амплифицировали по частям, разделяя его последовательности на 2 (N- и C-фрагменты) или 3 части (N-, C1 и C2 фрагменты). Амплификацию проводили в 2 этапа: первый этап с внешними праймерами, второй – с внутренними. Условия выполнения реакции и использованные реактивы подробно описаны ранее [24].

После амплификации фрагментов гена *LMP1* их секвенировали в двух направлениях. ПЦР продукт предварительно очищали на мини-колонках фирмы «QIAGEN», используя соответствующие реактивы этой же фирмы. На реакцию брали примерно 100–200 нг ПЦР продукта, концентрацию ДНК оценивали визуально в агарозном геле.

Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3100-Avant. Данных секвенирования обрабатывали с помощью программ Chromas 230 и Vector NTI.

При использованных методиках число амплифицированных и подвергнутых изучению изолятов гена *LMP1* было следующим: от 14 больных ЛХ: 9 из опухолевой ткани и 2 из образцов крови/смывов ПР; от 12 больных НХЛ: 6 из опухолевой ткани и 5 из образцов крови/смывов ПР; от 23 больных РНГ: 22 из опухолевой ткани и 20 из образцов смывов ПР; от 12 больных РЖ: 9 из опухолевой ткани и 8 из смывов ПР. Исследованию подлежали ампликоны *LMP1*, полученные из всех 10 образцов крови больных ИМ и 22 образцов крови доноров/здоровых лиц. Негативные результаты амплификации, полученные при тестировании ДНК на присутствие *LMP1*, по-видимому, отражают низкое содержание в этих образцах клеток, инфицированных ВЭБ.

Варианты LMP1 у больных ВЭБ-ассоциированной патологией и у здоровых лиц

Число изолятов LMP1, амплифицированных из тестируемых тканей	Варианты LMP1 по классификациям R. Edwards и соавт. [18] и K. Sandvey и соавт. [20]						
	B95.8/ группа A	China 1	China 2	Med+	Med-	NC	"вне варианта"
Лимфоциты периферической крови доноров/здоровых лиц (n=22) и больных ИМ (n = 10)							
Доноры крови/здоровые лица n%	15 68,2	4 18,2	0 0,0	0 0,0	1 4,5	2 9,1	0 0,0
Больные ИМ n%	5 50,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0	2 20,0	1 10	2 20,0
Больные ЛХ (n = 14)							
Опухоль (л.у.) n%	4 44,4	1 11,1	0 0,0	0 0,0	2 22,2	2 22,2	0
Кровь /смыв ПР n%	1 50,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0	1 50	0
Больные НХЛ (n = 12)							
Опухоль (л.у.) n%	3 50,0	1 16,7	0 0,0	1 16,7	0 0,0	1 16,6	0 0,0
Кровь/смыв n%	2 40,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0	2 40,0	1 20,0
Больные РНГ (n = 23)							
Опухоль n%	6 27,3	2 9,1	0 0,00	9 40,9	2 9,1	1 4,5	2 9,1
Смыв ПР n%	6 30,0	0 0,0	0 0,0	6 30,0	4 20,0	3 15,0	1 5,0
Больные РЖ (n = 12)							
Опухоль n%	3 30,0	1 10,0	2 20,0	1 10,0	1 10,0	2 20,0	0 00,0
Смыв ПР n%	6 75,0	0 0,0	2 25,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0
Итого ...	49	8	3	17	11	14	6
Всего ...	108						

Примечание. л.у. – лимфатический узел (опухолевый конгломерат).

Определение антител к ВЭБ

Титры IgG-антител к вирусному капсидному (ВКА) и раннему (РА) антигенам ВЭБ определяли в плазме больных и доноров крови методом непрямой иммунофлюоресценции, условия постановки которой и учет получаемых результатов были описаны ранее [25]. Титры антител представляли в виде их среднегеометрических значений (СГЗ).

Статистический анализ

Точный тест Фишера использовали для сравнения достоверности различий между процентом содержанием вариантов LMP1 в аналогичных биологических образцах в соответствующих группах больных и здоровых лиц. Значения $p < 0,05$ указывало на наличие существенных различий.

Результаты и обсуждение

О степени распространения ВЭБ в России можно косвенно судить по инфицированности этим вирусом различных возрастных групп населения Москвы. Как известно, детей до полугода после рождения от инфекции защищают материнские антитела, а их первичное заражение ВЭБ происходит в возрасте от 2 до 9 лет, что отражено на рисунке. При этом СГЗ титров антител к ВКА и процент инфицированных лиц к 5–9 годам достигают практически максимальных значений. С возрастом СГЗ титров вирусспецифических антител к этому же антигену незначительно снижаются

при высоком проценте инфицированных лиц (от 85,7 до 100%). Исключение составили лица в двух группах старше 55 лет, у которых при 100% инфицированности вирусом СГЗ титров антител к ВКА превысили соответствующие значения у лиц среднего возраста в 2–3 раза, что, вероятно, объясняется снижением у пожилых лиц иммунного статуса. Динамика СГЗ титров антител к РА по сути дела повторяет таковую к ВКА.

Секвенсный анализ нуклеотидных последовательностей гена LMP1, амплифицированного из ДНК лимфоцитов периферической крови здоровых лиц (доноров/здоровых вирусносителей), транслированных в аминокислотные последовательности, выявил доминирование у них низкодивергентного варианта B95.8/A (68,2%, 15/22) (табл. 1). У больных ИМ, доброкачественным лимфолифферативным заболеванием, LMP1 B95.8/A также обнаруживали в высоком проценте случаев (50,0, 5/10). Интересно отметить, что высокая частота выявления указанного варианта LMP1 отмечена не только для здоровых лиц и больных ИМ, но и для больных с ВЭБ-ассоциированными опухолями, причем указанную закономерность наблюдали как для опухолевой ткани, так и для лимфоцитов периферической крови и/или эпителиальных клеток ПР (см. табл. 1). Наиболее высокий процент содержания варианта LMP1 B95.8/A в опухолевой ткани был обнаружен у больных НХЛ (50, 3/6), а в смывах ПР – у больных РЖ

Таблица 2

Варианты LMP1 из тестируемых образцов биологического материала больных РНГ

Код больного	Биопсия опухоли	Лимфоциты крови	Клетки смывов полости рта
Больные с совпадающими вариантами LMP1 в тестируемых образцах			
M2	B95.8/A	B95.8/A	B95.8/A
M23	B95.8/A	B95.8/A	B95.8/A
M27	Med+	н.а.	Med+
M28	Med+	Med+	Med+
M33	Med+	н.а.	Med+
M37	Med-	Med-	Med-
Lg115	B95.8/A	н.а.	B95.8/A
Больные с несовпадающими вариантами LMP1 в тестируемых образцах			
M6	B95.8/A	NC	NC
M7	Med+	Med-	Med-
M8	Ch1	B95.8/A	Med-
M11	NC	Med-	н.а.
M12	Med-	Med-	NC
M16	Med+	н.а.	B95.8/A
M20	Med-	NC	н.а.
M29	Med+	Med-	Med+
M42	Med+	Med-	Med+
M49	OC	Med+	Med-
Lg116	Ch1	н.а.	B95.8/A
Lg117	Med+	н.а.	B95.8/A
M47	B95.8/A	B95.8/A	BB

Примечание. н.а. – LMP1 не был амплифицирован; BB – «вне варианта».

(75,0, 6/8). В то же время высокодивергентные варианты LMP1 Ch1 и Med+, содержащие делецию 10 а.к. и характеризующиеся повышенной трансформирующей активностью, хоть и в невысоком проценте случаев, выявляли исключительно в образцах опухолевой ткани у тех же больных. Так, для больных ЛХ этот показатель был равен 11,1% (1/9), для больных НХЛ – 33,3% (2/6), для больных РНГ – 50,0% (11/22) и для больных РЖ – 22,2% (2/9). Эти результаты позволяют теоретически предположить, что ВЭБ-ассоциированные патологии могут возникать лишь у лиц, являющихся носителями вариантов LMP1 Ch1 и Med+. Однако обнаружение высоко-туморогенного варианта LMP1 Ch1 в 18,2% (4/22) образцов крови здоровых лиц опровергает такую возможность. Полученные данные свидетельствуют о персистенции среди населения России штаммов ВЭБ, подобных делетированному варианту Sao, которые содержат ген, обладающий выраженным трансформирующим потенциалом. Полученные данные совпадают с результатами других исследователей, указывающими на отсутствие вариантов LMP1, специфически ассоциированных с возникновением ВЭБ-ассоциированных патологий [26].

Важно отметить, что при анализе образцов LMP1, полученных от больных ИМ (2 образца), НХЛ (1 образец) и РНГ (3 образца) обнаружены аминокислотные последовательности, которые отличались друг от

друга и от известных вариантов, вследствие чего были обозначены нами как образцы «вне варианта» (BB) [27]. Примечателен и факт отсутствия в тестируемых группах больных и здоровых лиц варианта LMP1 Alaska и обнаружение широко распространенного в Китае варианта LMP1 Ch2 в опухолевой ткани и смыве ПР только у больных РЖ [18]. Имели ли какое-либо отношение к Китаю и его жителям эти больные, осталось неизвестным.

Несовпадающие варианты LMP1, обнаруживаемые в образцах опухоли и крови/смывов ПР, на примере больных РНГ представлены в табл. 2. Этот феномен можно, по-видимому, объяснить разными условиями и характером экспрессии ВЭБ в разных клетках-мишенях. В лимфоцитах периферической крови (В-клетках памяти) вирус персистирует в виде эписомальной ДНК, когда экспрессируется минимальное число вирусных генов, при этом вирус в В-клетках лишь изредка подвергается литической репликации. Эпителиальные же клетки ПР, как правило, подвергаются литической репликации, что сопровождается экспрессией целого спектра вирусных генов и формированием вирусных частиц. Для опухолевых клеток характерен скорее 2-й тип латентности с экспрессией ограниченного числа генов. Известно также, что в организме вирусносителя, как правило, постоянно происходит передача вирусных штаммов между полостью рта и периферической кровью. В полости же рта различные штаммы вируса сохраняются в течение продолжительного времени [28]. Таким образом, клеточное и органное происхождение вируса, вероятно, определяет тип вируса и вариант его онгена LMP1.

Несмотря на генетическую гетерогенность российских вариантов вирусного онкогена LMP1, амплифицируемых из тестируемых образцов больных и здоровых лиц, для них характерно наличие общих мутаций. Среди точечных нуклеотидных и дедуктивных а.к.-последовательностей LMP1 абсолютно преобладающими являются замены изолейцина на лейцин в 85-м положении (I85L), фенилаланина на тирозин в 106-м положении (F106Y), глутаминовой кислоты на глутамин в 328-м положении (E328Q) и серина на треонин в 366-м положении (S366T). Функциональное значение а.к.-замен в 85-й и 106-й позициях, специфических для высокотуморогенного варианта LMP1 Sao, показано в работе T. Nitta и соавт. [29]. В частности, ими было обнаружено, что мутантный вариант LMP1 B95.8, содержащий эти а.к.-замены, обладает пониженной способностью вызывать смерть клеток, но в случае наличия только одной замены, цитолитический эффект изменяется полностью или частично. В других исследованиях наличие перечисленных выше мутаций (I85L, F106Y, E328Q, S366T) также связывают со снижением цитотоксичности и усилением трансформирующей активности белка LMP1 [27, 30]. Встречающаяся замена метионина на изолейцин в 129-м положении (M129I) является критичной как для функциональной активности LMP1, так и для самого вируса. Эта замена отменяет негативную регуляцию сигнальных функций LMP1, при этом вирус не может завершить полноценный литический цикл [30]. Обнаруженная нами мутация S366T имеет, по-видимому, принципиальное значение, так как присутствует во всех образцах LMP1, описанных в

ЛИТЕРАТУРА

большинстве опубликованных работ. Ее возможная роль сводится к прямому усилению трансформирующих свойств *LMP1* по не известному пока механизму вследствие инактивации криптического сайта связывания HOS/ β -TrCP [23].

Важно также отметить, что в российских изолятах *LMP1* мутация в 212-м положении (G212S) полностью отсутствует, тогда как в других регионах мира она встречается довольно часто [31]. В то же время показано, что совокупность замен в 212, 366 и 350-м (S350A) положениях приводит к неспособности *LMP1* связывать HOS белки (SCF HOS/ β -TrCP) и, таким образом, подвергаться убиквитинированию [23]. Не подвергшийся убиквитинированию *LMP1* в результате его накопления в клетке дает выраженный трансформирующий эффект благодаря нарастающей активации под его воздействием сигнального пути NF κ B [32]. Другие обнаруженные нами точечные мутации (D210E, G352S, W39C, L93V, A96T, I122L, S239M) ранее не были описаны, при этом некоторые из них локализируются вблизи функциональных доменов *LMP1* и, возможно, могут оказывать влияние на свойства этой молекулы.

На основании анализа полученных результатов и данных литературы можно предположить наличие двух самостоятельных направлений генетического дрейфа гена *LMP1*. Одно направление, по-видимому, свойственно не претерпевшим серьезных мутационных перестроек так называемым низкодивергентным образцам гена, относящимся к варианту B95.8/A и характеризующимся наличием «молчащей» замены T на C в 356-м кодоне *LMP1*, что соответствует 168–253-му положению генома ВЭБ [27,33]. Низкий уровень дивергентности у вариантов типа B95.8/A подтверждается и отсутствием делеции а.к. в 276–280-м положении, представляющей *box1*-область для распознавания Jak3 [34]. Данная делеция, относящаяся также к числу Сао-подобных, обнаружена нами во многих российских образцах *LMP1*, но ее роль остается неизвестной. Другое направление, вероятно, имеет место у представителей высокодивергентных образцов *LMP1*, относящихся к вариантам Ch1, Ch2, Med+, Med- и NC и содержащих альтернативную «молчащую» замену A на T в 342-м кодоне, где A замещен на T в 168–295-м нуклеотиде. При этом ни один из образцов *LMP1* в двух сравниваемых группах не содержал одновременно обе указанные «молчащие» замены. Следует, однако, отметить, что общий тренд генетической перестройки гена во времени, по-видимому, направлен в сторону накопления мутационных изменений и усиления его трансформирующего потенциала.

Таким образом, результаты нашего исследования, проведенного, хотя и на небольшом клиническом материале, дают достаточно четкое представление об инфицированности населения страны ВЭБ и полиморфизме его главного онкогена *LMP1* у больных с различными ВЭБ-ассоциированными патологиями и здоровых лиц. Расширение таких исследований с использованием большего числа наблюдений, особенно в различных географических и климатических регионах, несомненно позволит уточнить представленные данные и дополнить существующие представления о канцерогенезе, ассоциированном с ВЭБ.

1. Young L.S., Rickinson A.B. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat. Rev. Cancer*. 2004; 4(10): 757–68.
2. Young L.S., Murray P.G. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene*. 2003; 22(33): 5108–21.
3. Rickinson A. Epstein-Barr virus. *Virus Res*. 2002; 82(1-2): 109–13.
4. Kaye K.M., Izumi K.M., Kieff E. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1993; 90(19): 9150–54.
5. Moorthy R.K., Thorley-Lawson D.A. 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(3): 1638–46.
6. Dirmeier U., Neuhierl B., Kilger E., Reischbach G., Sandberg M.L., Hammerschmidt W. Latent membrane protein 1 is critical for efficient growth transformation of human B cells by Epstein-Barr virus. *Cancer Res*. 2003; 63(11): 2982–9.
7. Eliopoulos A.G., Young L.S. LMP1 structure and signal transduction. *Semin. Cancer Biol*. 2001; 11(6): 435–44.
8. Hu L.F., Zabarovsky E.R., Chen F., Cao S.L., Ernberg I., Klein G. et al. Isolation and sequencing of the Epstein-Barr virus BNLF-1 gene (*LMP1*) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma. *J. Gen. Virol*. 1991; 72 (10): 2399–409.
9. Hu L.F., Chen F., Zheng X., Ernberg I., Cao S.L., Christensson B. et al. Clonability and tumorigenicity of human epithelial cells expressing the EBV encoded membrane protein LMP1. *Oncogene*. 1993; 8(6): 1575–83.
10. Смирнова К.В., Дидук С.В., Гурцевич В.Э. Функциональный анализ вариантов латентного мембранного белка 1 (*LMP1*) вируса Эпштейна-Барр у больных лимфопролиферативными заболеваниями. *Биомедицинская химия*. 2011; 57(1): 114–26.
11. Dawson C.W., Port R.J., Young L.S. The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Semin. Cancer Biol*. 2012; 22(2): 144–53.
12. Horikawa T., Yoshizaki T., Kondo S., Furukawa M., Kaizaki Y., Pagano J.S. Epstein-Barr Virus latent membrane protein 1 induces Snail and epithelial-mesenchymal transition in metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Br. J. Cancer*. 2011; 104(7): 1160–67.
13. Kung C.P., Meckes D.G., Jr., Raab-Traub N. Epstein-Barr virus LMP1 activates EGFR, STAT3, and ERK through effects on PKCdelta. *J. Virol*. 2011; 85(9): 4399–08.
14. Fahraeus R., Rymo L., Rhim J.S., Klein G. Morphological transformation of human keratinocytes expressing the LMP gene of Epstein-Barr virus. *Nature*. 1990; 345(6274): 447–9.
15. Chen M.L., Tsai C.N., Liang C.L., Shu C.H., Huang C.R., Sulitzeanu D. et al. Cloning and characterization of the latent membrane protein (LMP) of a specific Epstein-Barr virus variant derived from the nasopharyngeal carcinoma in the Taiwanese population. *Oncogene*. 1992; 7(11): 2131–40.
16. Miller W.E., Cheshire J.L., Baldwin A.S.Jr., Raab-Traub N. The NPC derived C15 LMP1 protein confers enhanced activation of NF-kappa B and induction of the EGFR in epithelial cells. *Oncogene*. 1998; 16(14): 1869–77.
17. Walling D.M., Shebib N., Weaver S.C., Nichols C.M., Flaits C.M., Webster-Cyriaque J. The molecular epidemiology and evolution of Epstein-Barr virus: sequence variation and genetic recombination in the latent membrane protein-1 gene. *J. Infect. Dis*. 1999; 179(4): 763–74.
18. Edwards R.H., Seillier-Moiseiwitsch F., Raab-Traub N. Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein-Barr virus strains. *Virology*. 1999; 261(1): 79–95.
19. Nitta T., Chiba A., Yamamoto N., Yamaoka S. Lack of cytotoxic property in a variant of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 isolated from nasopharyngeal carcinoma. *Cell. Signal*. 2004; 16(9): 1071–81.
20. Sandvej K., Munch M., Hamilton-Dutoit S. Mutations in the Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (BNLF-1) gene in spontaneous lymphoblastoid cell lines: effect on in vitro transformation associated parameters and tumorigenicity in SCID and nude mice. *Clin. Mol. Pathol*. 1996; 49(5): 290–7.
21. Zhou X.G., Sandvej K., Li P.J., Ji X.L., Yan Q.H., Zhang X.P. et al. Epstein-Barr virus gene polymorphisms in Chinese Hodgkin's disease cases and healthy donors: identification of three distinct virus variants. *J. Gen. Virol*. 2001; 82(Pt 5): 1157–67.
22. Mainou B.A., Raab-Traub N. LMP1 strain variants: biological and molecular properties. *J. Virol*. 2006; 80(13): 6458–68.
23. Tang W., Pavlish O.A., Spiegelman V.S., Parkhitko A.A., Fuchs S.Y. Interaction of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 with SCFHOS/beta-TrCP E3 ubiquitin ligase regulates extent of NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem*. 2003; 278(49): 48942–9.
24. Hahn P., Novikova E., Scherback L., Janik C., Pavlish O., Arkhipov V. et al. The LMP1 gene isolated from Russian nasopharyngeal carcinoma has no 30-bp deletion. *Int. J. Cancer* 2001; 91(6): 815–21.

25. Gurtsevitch V., Ruiz R., Stepina V., Plachov I., Le Riverend E., Glazkova T. et al. Epstein-Barr viral serology in nasopharyngeal carcinoma patients in the USSR and Cuba, and its value for differential diagnosis of the disease. *Int. J. Cancer*. 1986; 37(3): 375–81.
26. Cui Y., Wang Y., Liu X., Chao Y., Xing X., Zhao C. et al. Genotypic analysis of Epstein-Barr virus isolates associated with nasopharyngeal carcinoma in Northern China. *Intervirology*. 2011; 54(3): 131–8.
27. Павлиш О.А., Дидук С.В., Смирнова К.В., Щербак Л.Н., Гончарова Е.В., Шалгинских Н.А. и др. Мутации гена LMP1 вируса Эпштейна-Барр у российских больных лимфоидной патологией и здоровых лиц. *Вопросы вирусологии*. 2008; 53(1): 10–6.
28. Sitki-Green D., Covington M., Raab-Traub N. Compartmentalization and transmission of multiple Epstein-Barr virus strains in asymptomatic carriers. *J. Virol*. 2003; 77(3): 1840–7.
29. Nitta T., Chiba A., Yamamoto N., Yamaoka S. Lack of cytotoxic property in a variant of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 isolated from nasopharyngeal carcinoma. *Cell Signal*. 2004; 16(9): 1071–81.
30. Faumont N., Chanut A., Benard A., Cogne N., Delsol G., Feuillard J. et al. Comparative analysis of oncogenic properties and nuclear factor-kappaB activity of latent membrane protein 1 natural variants from Hodgkin's lymphoma's Reed-Sternberg cells and normal B-lymphocytes. *Haematologica*. 2009; 94(3): 355–63.
31. Nagamine M., Takahara M., Kishibe K., Nagato T., Ishii H., Bando N. et al. Sequence variations of Epstein-Barr virus LMP1 gene in nasal NK/T-cell lymphoma. *Virus Genes*. 2007; 34(1): 47–54.
32. Дидук С.В., Смирнова К.В., Павлиш О.А., Гурцевич В.Э. Роль функционально значимых мутаций гена LMP1 вируса Эпштейна-Барр в активации клеточных сигнальных путей. *Биохимия*. 2008; 73(10): 1414–21.
33. Sandvej K., Gratama J.W., Munch M., Zhou X.G., Bolhuis R.L., Andresen B.S. et al. Sequence analysis of the Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein-1 gene and promoter region: identification of four variants among wild-type EBV isolates. *Blood*. 1997; 90(1): 323–30.
34. Gires O., Kohlhuber F., Kilger E., Baumann M., Kieser A., Kaiser C. et al. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *EMBO J*. 1999; 18(11): 3064–73.
14. Fahraeus R., Rymo L., Rhim J.S., Klein G. Morphological transformation of human keratinocytes expressing the LMP gene of Epstein-Barr virus. *Nature*. 1990; 345(6274): 447–9.
15. Chen M.L., Tsai C.N., Liang C.L., Shu C.H., Huang C.R., Sulitzeanu D. et al. Cloning and characterization of the latent membrane protein (LMP) of a specific Epstein-Barr virus variant derived from the nasopharyngeal carcinoma in the Taiwanese population. *Oncogene*. 1992; 7(11): 2131–40.
16. Miller W.E., Cheshire J.L., Baldwin A.S.Jr., Raab-Traub N. The NPC derived C15 LMP1 protein confers enhanced activation of NF-kappa B and induction of the EGFR in epithelial cells. *Oncogene*. 1998; 16(14): 1869–77.
17. Walling D.M., Shebib N., Weaver S.C., Nichols C.M., Flaitz C.M., Webster-Cyriaque J. The molecular epidemiology and evolution of Epstein-Barr virus: sequence variation and genetic recombination in the latent membrane protein-1 gene. *J. Infect. Dis*. 1999; 179(4): 763–74.
18. Edwards R.H., Seillier-Moisewitsch F., Raab-Traub N. Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein-Barr virus strains. *Virology*. 1999; 261(1): 79–95.
19. Nitta T., Chiba A., Yamamoto N., Yamaoka S. Lack of cytotoxic property in a variant of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 isolated from nasopharyngeal carcinoma. *Cell Signal*. 2004; 16(9): 1071–81.
20. Sandvej K., Munch M., Hamilton-Dutoit S. Mutations in the Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (BNLF-1) gene in spontaneous lymphoblastoid cell lines: effect on in vitro transformation associated parameters and tumorigenicity in SCID and nude mice. *Clin. Mol. Pathol*. 1996; 49(5): 290–7.
21. Zhou X.G., Sandvej K., Li P.J., Ji X.L., Yan Q.H., Zhang X.P. et al. Epstein-Barr virus gene polymorphisms in Chinese Hodgkin's disease cases and healthy donors: identification of three distinct virus variants. *J. Gen. Virol*. 2001; 82(Pt 5): 1157–67.
22. Mainou B.A., Raab-Traub N. LMP1 strain variants: biological and molecular properties. *J. Virol*. 2006; 80(13): 6458–68.
23. Tang W., Pavlish O.A., Spiegelman V.S., Parkhitko A.A., Fuchs S.Y. Interaction of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 with SCFHOS/beta-TrCP E3 ubiquitin ligase regulates extent of NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem*. 2003; 278(49): 48942–9.
24. Hahn P., Novikova E., Scherback L., Janik C., Pavlish O., Arkhipov V. et al. The LMP1 gene isolated from Russian nasopharyngeal carcinoma has no 30-bp deletion. *Int. J. Cancer* 2001; 91(6): 815–21.
25. Gurtsevitch V., Ruiz R., Stepina V., Plachov I., Le Riverend E., Glazkova T. et al. Epstein-Barr viral serology in nasopharyngeal carcinoma patients in the USSR and Cuba, and its value for differential diagnosis of the disease. *Int. J. Cancer*. 1986; 37(3): 375–81.

REFERENCES

1. Young L.S., Rickinson A.B. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat. Rev. Cancer*. 2004; 4(10): 757–68.
2. Young L.S., Murray P.G. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene*. 2003; 22(33): 5108–21.
3. Rickinson A. Epstein-Barr virus. *Virus Res*. 2002; 82(1-2): 109–13.
4. Kaye K.M., Izumi K.M., Kieff E. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1993; 90(19): 9150–54.
5. Moorthy R.K., Thorley-Lawson D.A. 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(3): 1638–46.
6. Dirmeier U., Neuhierl B., Kilger E., Reisbach G., Sandberg M.L., Hammerschmidt W. Latent membrane protein 1 is critical for efficient growth transformation of human B cells by Epstein-Barr virus. *Cancer Res*. 2003; 63(11): 2982–9.
7. Eliopoulos A.G., Young L.S. LMP1 structure and signal transduction. *Semin. Cancer Biol*. 2001; 11(6): 435–44.
8. Hu L.F., Zabarovsky E.R., Chen F., Cao S.L., Ernberg I., Klein G. et al. Isolation and sequencing of the Epstein-Barr virus BNLF-1 gene (LMP1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma. *J. Gen. Virol*. 1991; 72 (10): 2399–409.
9. Hu L.F., Chen F., Zheng X., Ernberg I., Cao S.L., Christensson B. et al. Clonability and tumorigenicity of human epithelial cells expressing the EBV encoded membrane protein LMP1. *Oncogene*. 1993; 8(6): 1575–83.
10. Smirnova K.V., Diduk S.V., Gurtsevich V.E. Functional analysis of Epstein-Barr virus latent membrane proteins (LMP1) in patients with lymphoproliferative disorders. *Biomeditsinskaya Khimiya*. 2011; 57(1): 114–26. (in Russian)
11. Dawson C.W., Port R.J., Young L.S. The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Semin. Cancer Biol*. 2012; 22(2): 144–53.
12. Horikawa T., Yoshizaki T., Kondo S., Furukawa M., Kaizaki Y., Pagano J.S. Epstein-Barr Virus latent membrane protein 1 induces Snail and epithelial-mesenchymal transition in metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Br. J. Cancer*. 2011; 104(7): 1160–67.
13. Kung C.P., Meckes D.G., Jr., Raab-Traub N. Epstein-Barr virus LMP1 activates EGFR, STAT3, and ERK through effects on PKCdelta. *J. Virol*. 2011; 85(9): 4399–08.
27. Павлиш О.А., Дидук С.В., Смирнова К.В., Щербак Л.Н., Гончарова Е.В., Шалгинских Н.А. et al. Mutations of the Epstein-Barr virus LMP1 gene mutations in Russian patients with lymphoid pathology and healthy individuals. *Toprosy Virusologii*. 2008; 53(1): 10–6. (in Russian)
28. Sitki-Green D., Covington M., Raab-Traub N. Compartmentalization and transmission of multiple Epstein-Barr virus strains in asymptomatic carriers. *J. Virol*. 2003; 77(3): 1840–7.
29. Nitta T., Chiba A., Yamamoto N., Yamaoka S. Lack of cytotoxic property in a variant of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 isolated from nasopharyngeal carcinoma. *Cell Signal*. 2004; 16(9): 1071–81.
30. Faumont N., Chanut A., Benard A., Cogne N., Delsol G., Feuillard J. et al. Comparative analysis of oncogenic properties and nuclear factor-kappaB activity of latent membrane protein 1 natural variants from Hodgkin's lymphoma's Reed-Sternberg cells and normal B-lymphocytes. *Haematologica*. 2009; 94(3): 355–63.
31. Nagamine M., Takahara M., Kishibe K., Nagato T., Ishii H., Bando N. et al. Sequence variations of Epstein-Barr virus LMP1 gene in nasal NK/T-cell lymphoma. *Virus Genes*. 2007; 34(1): 47–54.
32. Diduk S.V., Smirnova K.V., Pavlish O.A., Gurtsevich V.E. Functionally significant mutations in the Epstein-Barr virus LMP1 gene and their role in activation of cell signaling pathways. *Biokhimiya*. 2008; 73(10): 1134–9. (in Russian)
33. Sandvej K., Gratama J.W., Munch M., Zhou X.G., Bolhuis R.L., Andresen B.S. et al. Sequence analysis of the Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein-1 gene and promoter region: identification of four variants among wild-type EBV isolates. *Blood*. 1997; 90(1): 323–30.
34. Gires O., Kohlhuber F., Kilger E., Baumann M., Kieser A., Kaiser C. et al. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *EMBO J*. 1999; 18(11): 3064–73.