

## КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК ВМ 09-112

©Коллектив авторов

### ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВАРИАНТОВ ЛАТЕНТНОГО МЕМБРАННОГО БЕЛКА 1 (LMP1) ВИРУСА ЭПШТЕЙНА-БАРР У БОЛЬНЫХ ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

*К.В. Смирнова, С.В. Дидук, В.Э. Гурцевич\**

Государственное Учреждение Российский Онкологический Научный Центр  
им. Н.Н. Блохина Российской Академии Медицинских наук,  
Каширское шоссе, 24, Москва; тел.: (495) 324-25-64; факс: (495) 324-12-05;  
эл. почта: gurtsevitch@crc.umos.ru

Латентный мембранный белок 1 (LMP1), кодируемый геном (*LMP1*) вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ), представляет собой трансмембранный белок, способный активировать множество сигнальных путей и транскрипционных факторов клетки, что приводит к ее трансформации. В данной работе проведено секвенирование полноразмерных вариантов *LMP1*, изолированных от российских больных лимфомой Ходжкина (ЛХ), неходжкинскими лимфомами (НХЛ) и инфекционным мононуклеозом (ИМ). Филогенетический анализ полученных последовательностей выявил доминирование вариантов LMP1, относящихся к белкам низкодивергентной группы LMP1-B95.8b, характеризующейся минимальным набором мутаций. Исследование биологических свойств российских представителей этой группы показало, что экспрессия изучаемых вариантов LMP1 в эмбриональных клетках почки человека НЕК293 сопровождалась незначительным усилением активации транскрипционного фактора NF-κB и не оказывала существенного влияния на активацию транскрипционного фактора AP-1. Все изучаемые низкодивергентные варианты LMP1, экспрессирующиеся в клетках Rat-1, вызывают активацию индуцибельной NO-синтазы (iNOS) и продукцию оксида азота (NO), при этом уровень накопления последней оказался ниже такового, вызванного прототипным низкотрансформирующим вариантом LMP1-B95.8. Полученные данные свидетельствуют о том, что варианты LMP1, наиболее часто встречающиеся в России у больных ВЭБ-ассоциированными лимфопролиферативными заболеваниями вне зависимости от характера патологического процесса, доброкачественного (ИМ) или злокачественного (ЛХ, НХЛ), характеризуются минимальным набором мутаций и невысокой способностью активировать основные сигнальные пути клетки. При этом кроме умеренной активации NF-κB и индукции iNOS в процессах трансформации клеток, индуцированных ВЭБ, по-видимости, принимают участие и другие факторы.

**Ключевые слова:** вирус Эпштейна-Барр, белок LMP1, NF-κB, iNOS, NO.

**ВВЕДЕНИЕ.** Латентный мембранный белок 1 (LMP1) вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ), - интегральный мембранный белок, кодируемый одноимённым геном *LMP1*, экспрессия которого приводит к трансформации клеток крысиных фибробластов и В-лимфоцитов *in vitro* [1, 2]. LMP1 играет также ключевую роль в развитии лимфом у трансгенных мышей [3]. В состав белка входят два терминальных цитоплазматических и шесть трансмембранных доменов [4]. Длинный С-терминальный цитоплазматический домен ответственен за индукцию

*Используемые сокращения:* LMP1 – латентный мембранный белок 1, ВЭБ – вирус Эпштейна-Барр, ЛХ – лимфома Ходжкина, НХЛ – неходжкинские лимфомы, ИМ – инфекционный мононуклеоз, STAR1 – проксимальная трансактивирующая область LMP1, STAR2 – дистальная трансактивирующая область LMP1, пн – пар нуклеотидов, NO – окись азота, iNOS – индуцибельная NO-синтаза, Dex – дексаметазон.

\* - адресат для переписки

множества клеточных сигнальных каскадов, приводящих к активации NF-κB, c-Jun N-терминальной киназы (JNK), STAT 1/3, p38 MAPK [5-10]. Основной функцией короткого N-терминального, а также трансмембранных доменов, является интеграция молекул LMP1 в клеточную мембрану и их агрегация между собой [11].

Филогенетический анализ вариантов LMP1, выделенных из опухолевой ткани больных ВЭБ-ассоциированными патологиями в различных географических регионах, выявил аккумуляцию ряда мутаций в этом гене, что свидетельствует о высокой степени его полиморфизма. В настоящее время рассматриваются три основных механизма изменчивости *LMP1*: 1) возникновение точечных мутаций, ведущих к замене отдельных аминокислот; 2) образование делеций и дупликаций; 3) гомологичная рекомбинация как следствие ко-инфекции лимфоидных или эпителиальных клеток двумя различными штаммами ВЭБ [12]. Исследование отдельных мутаций этого гена выявило способность некоторых из них влиять на биологические свойства молекулы LMP1, что, вероятно, играет важную роль в этиопатогенезе заболеваний, вызываемых ВЭБ. Наибольший интерес представляют мутации С-терминального цитоплазматического домена, которые, как показано ранее, влияют на иммуногенность и время полужизни LMP1, что в конечном итоге способствует усилению его трансформирующего воздействия на клетку [13-16]. Не менее важную роль в изменениях свойств белка играют и точечные мутации, локализованные в трансмембранном домене LMP1; некоторые из них приводят к значительному снижению цитотоксического действия вирусного белка на клетку, что, возможно, влияет на трансформирующий потенциал этого онкобелка [15].

Влияние мутаций на биологические свойства LMP1 особенно чётко прослеживается при сравнении двух генетически существенно различающихся вариантов этого белка, а именно обладающего низкой трансформирующей активностью прототипного LMP1-B95.8 и высокотуморогенного LMP1-Сао [13-17]. Эти различия выражаются в первую очередь в более высоких уровнях активации ключевых сигнальных путей клетки вариантом LMP1-Сао по сравнению с LMP1-B95.8 [7-10]. Различия среди этих вариантов LMP1 также наблюдаются при активации синтеза индуцибельной NO-синтазы (iNOS), и как следствие, продукции оксида азота (NO). NO является свободным короткоживущим радикалом, способным наряду с цитокинами влиять на клеточные эффекторные системы, контролируемые пролиферацию, апоптоз, дифференцировку и устойчивость клетки к стрессовым воздействиям [18-20].

Полученные ранее данные свидетельствуют о персистенции в России широкого диапазона штаммов LMP1, в состав которых входят варианты с варьирующим числом мутаций в опухолевой и нормальной тканях вне зависимости от имеющегося у больного типа патологии [16]. В этих вариантах LMP1 обнаружены мутации, характерные для таких высокодивергентных штаммов, выделяемых в классификации Edwards с соавт. (1999), как Ch1 (China 1), Ch2 (China 2), NC (New York City), Med+ (Mediterranean +), Med- (Mediterranean -), а также низкодивергентного штамма B95.8b, предложенного в классификации Sandvej с соавт. (1997), характеризующегося минимальным набором мутаций [21, 22].

В представленной работе с помощью секвенирования и филогенетического анализа вариантов *LMP1*, изолированных из тканей российских больных ВЭБ-ассоциированными лимфопролиферативными заболеваниями, в частности инфекционным мононуклеозом (ИМ), лимфомой Ходжкина (ЛХ) и неходжкинскими лимфомами (НХЛ), доказано преобладание монофилетической группы, относящейся к низкодивергентному штамму B95.8b. Учитывая происхождение изучаемых вариантов LMP1 из тканей больных доброкачественными (ИМ) и злокачественными (ЛХ и НХЛ) заболеваниями, представляло интерес сравнить их функциональные свойства с таковыми для высокодивергентного варианта LMP1-Сао, обладающего выраженным трансформирующим потенциалом, а также прототипного варианта LMP1-B95.8 с невысокой трансформирующей активностью. С этой целью

нами проведён анализ активации ключевых транскрипционных факторов NF-κB и AP-1, а также индукции iNOS и уровня внутриклеточного накопления NO, российскими вариантами LMP1 с минимальным набором мутаций с одной стороны, и указанными контрольными вариантами белка с другой.

### МЕТОДИКА.

*Клинический материал.* Материалом для исследования служили образцы крови, биопсийный материал опухолей и смывы из ротоглотки от 14 больных лимфомой Ходжкина (ЛХ), 12 больных неходжкинскими лимфомами (НХЛ), проходящих лечение в Российском Онкологическом Научном Центре им. Н.Н. Блохина РАМН (РОНЦ РАМН), а также 10 образцов крови больных инфекционным мононуклеозом (ИМ) из детской клинической больницы №38 г. Москвы. Функциональный анализ проводили с использованием вариантов LMP1, принадлежащих к группе B95.8b, полученных из опухолевой ткани лимфомы Ходжкина (ЛХ-34.1, ЛХ-46.1) неходжкинской лимфомы (НХЛ-28.1, НХЛ-28.2 и НХЛ-41.3) и периферической крови больных инфекционным мононуклеозом (ИМ-2623, ИМ-2624).

*ПЦР-реакция и секвенирование.* Из собранных образцов клинического материала была экстрагирована ДНК. На следующем этапе каждый образец ДНК изучали на присутствие гена *LMP1* с помощью “гнездной” ПЦР, используя соответствующие пары праймеров. Реакцию проводили по общепринятой методике, описанной ранее [12]. Для секвенирования использовали метод, описанный Edwards et al. [23] с небольшими модификациями. 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. Обработку данных секвенирования проводили с помощью программ Sequence Scanner v.1.0 и Vector NTI.

*Филогенетический анализ.* Транслированные в программе Vector NTI аминокислотные последовательности выравнивались с помощью программ ClustalX и BioEdit [24]. Филогенетическое дерево было построено с помощью метода neighbor-joining [25] с использованием пакета программ PHYLIP и TreesonW [26]. Достоверность построенных филогенетических деревьев оценивали bootstrap-анализом [27].

*Плазмиды.* Векторные конструкции pSG5-LMP1-B95.8 и pSG5-LMP1-Cao были любезно предоставлены Ф. Грассером (Гамбург, Германия). Исследуемые варианты гена *LMP1* с использованием соответствующих эндонуклеаз рестрикции переклонировались нами из системы pGEM-T Easy (“Promega”, США) в эукариотический экспрессирующий вектор pSG5 и в ретровирусный вектор pBabe-puro (pBabe). Для анализа активации транскрипционного фактора NF-κB использовали репортерную плазмиду κB-ConALuc, любезно предоставленную Ф. Грассером. Для проведения анализа активации JNK сигнального пути использовали *jun2*-люциферазную репортерную плазмиду (AP1-Luc), любезно предоставленную М. Роу (Кардифф, Уэльс).

*Культуры клеток, приготовление ретровирусного стока и трансдукция.* Все клеточные линии культивировали на среде DMEM с добавлением 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (GIBCO), 2 mM L-глутамина, 100 ед/мл гентамицина и 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Клетки линии Phi-NX-Ampho Phoenix-A (дериват клеток HEK293) трансфицировали генетическими конструкциями, созданными на основе pBabe-puro с использованием LipofectAMINE Plus (“Invitrogen”, США) в соответствии с инструкциями производителя. Через 48 ч после трансфекции собирали содержащий вирусные частицы супернатант и центрифугировали его со скоростью 3000 об/мин в течение 5 мин при 4°C. Клеточную линию Rat-1 трансдуцировали очищенным от клеточного дебриса супернатантом в присутствии полибрена (4 мг/мл) в течение ночи. Селекцию клеток проводили в присутствии пуромицина (5 мг/мл, “Sigma”, США) в течение двух недель.

*Получение клеточных лизатов и Вестерн-блот-анализ.* Клетки линии Rat-1, постоянно экспрессирующие различные варианты LMP1, трижды отмывали в PBS, суспендировали в 200 мкл лизирующего буфера (трис-HCl pH 6,8; 2% SDS; 10% глицерин; 0,1% β-меркаптоэтанол), обрабатывали ультразвуком Ultrasonic Amplifier (Англия) и прогревали при 100°C в течение 5 мин. Полученный клеточный лизат осветляли с помощью центрифугирования при 12000 об/мин в течение 10 мин при 4°C. Концентрацию белка в полученном экстракте определяли по методу Брэдфорд [28], оптическую плотность экстракта измеряли, используя спектрофотометр Jenway 6305 (Англия). Электрофоретическое разделение белков проводили в 12,5%-ном ПААГ с 0,1% SDS в буфере для электрофореза (25 mM трис-HCl; 200 mM глицин; 0,1% SDS) при силе тока 20 мА. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли с помощью аппарата для полусухого переноса Fastblot B43 ("Biometra", Германия) при напряжении 2,5 мА/см, при 4°C в течение 30 мин. Эффективность переноса белков определяли окрашиванием мембраны раствором Ponceau S. Краситель удаляли промывкой в 0,01 M трис-HCl. Блокировку проводили в течение 1 ч в 5%-ном растворе обезжиренного сухого молока, растворенного в PBS. Затем в зависимости от цели эксперимента мембрану с белками инкубировали в течение 12 ч при 4°C со следующими моноклональными антителами: к iNOS – NOS-20 ("Santa-Cruz", США), а также антителами к β-катенину ("Sigma") и к LMP1 – S12 (получены от Ф. Грассера). После обработки антителами мембрану промывали в PBS и инкубировали со вторичными антимышиными и антикрысиными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, в течение 1 ч при 4°C. Мембрану промывали 5 раз в PBS, после чего комплекс антиген-антитело выявляли путем окрашивания раствором 3,3'-диаминобензидина и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

*Люциферазный анализ.* Активность транскрипционных факторов NF-κB и AP-1 определяли количественно по экспрессии люциферазы из репортерных плазмид κB-ConA-Luc и AP1-Luc, котрансфицированных в клетки HEK293 вместе с векторными конструкциями, содержащими полноразмерные варианты LMP1 [29]. Через 24 ч после трансфекции клетки отмывали в PBS и лизировали в 1×RLB буфере ("Promega"). Измерение уровня экспрессии люциферазы проводили согласно рекомендациям производителя. С этой целью брали 30 мкл клеточного экстракта, добавляли 100 мкл раствора люциферина и интенсивность свечения фиксировали на люминометре "Tuner BioSystem" (США). Люциферазную активность измеряли в течение 10 с. При этом в опыт брали по три независимые пробы от каждого образца. Эффективность трансфекции определяли с помощью Beta-Galactosidase Enzyme Assay System ("Promega"), согласно рекомендациям производителя.

*Нитрат/нитритный анализ.* Определение уровня накопления окиси азота (NO) проводили по образованию его стабильных конечных продуктов (нитрата/нитрита) в супернатанте культивируемых клеток Rat-1. Общее количество нитрата/нитрита определяли с помощью набора реагентов для нитрат/нитритного анализа ("Cayman Chemical Co.", США), используя рекомендации производителя. Супернатант (80 мкл) инкубировали с нитратредуктазой (20 мкл) при комнатной температуре в течение 1 ч, затем добавляли 100 мкл реактива Грисса (1% сульфаниловой кислоты, 0,1% дигидрохлорид нафтилэтилендиамина, 2,5% фосфорной кислоты). Оптическую плотность каждого образца анализировали на микропланшетном спектрофотометре при длине волны 540 нм. Для построения калибровочной кривой использовали нитрит натрия. Измерения проводили в трёх независимых экспериментах, для проведения которых в каждый культуральный флакон пассировали одинаковое количество клеток (5×10<sup>5</sup> клеток в 1 мл).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

*Филогенетический анализ вариантов LMP1, изолированных от российских больных ВЭБ-ассоциированными заболеваниями.* Используя клинический материал российских больных ЛХ, НХЛ и ИМ, нами проведена амплификация



и секвенирование полноразмерных вариантов гена *LMP1*. Дальнейший филогенетический анализ показал, что исследуемые варианты вирусного онкобелка представляют собой гетерогенную популяцию, в которой чётко выделяется монофилетическая группа, отмеченная в классификации Sandvej с соавт. как штамм LMP1-B95.8b [22] (рис. 1). Как уже отмечалось выше, для представителей данной группы характерен низкий уровень дивергенции (3-4 критические замены а.к.). Среди точечных замен аминокислот абсолютно преобладающими в этих вариантах являются замены изолейцина на лейцин в 85 положении (I85L), фенилаланина на тирозин в 106 положении (F106Y), глутаминовой кислоты на глутамин в 328 положении (E328Q) и серина на треонин в 366 положении (S366T). Для представителей группы LMP1-B95.8b также характерно отсутствие Сао-подобной делеции 30 пар нуклеотидов (п.н.) и наличие “молчащей” замены Т на С в 356 кодоне LMP1 [22]. Не принадлежащие к этому штамму высокодивергентные варианты LMP1 (Ch1, Ch2, Med+, Med-, NC), выделяемые в классификации Edwards с соав., содержали альтернативную “молчащую” замену А→Т в 342 кодоне. Интересно отметить, что ни один из исследованных вариантов не содержал обе указанные “молчащие” замены нуклеотидов, что, возможно, свидетельствует о существовании двух самостоятельных дивергентных линий гена *LMP1*. Одна линия, к которой относится штамм B95.8b, не претерпела серьёзных мутационных перестроек в отличие от более дивергентных и гетерогенных представителей другой линии, к которой принадлежат остальные варианты LMP1.

Ранее показано, что функциональное значение некоторых встречающихся мутаций (I85L, F106Y, E328Q, S366T), проявляется в снижении цитотоксичности и усилении трансформирующей активности белка LMP1 [15, 29]. Другие точечные мутации, обнаруженные нами в исследуемых вариантах (D210E, G352S, W39C, L93V, A96T, I122L, S239M), ранее не описаны, однако некоторые из них локализуются вблизи функциональных доменов LMP1 и, возможно, могут оказывать влияние на свойства этой молекулы.

На следующем этапе исследования представлялось важным провести сравнительное изучение биологических свойств LMP1 российского происхождения, принадлежащих к группе B95.8b. С этой целью по два варианта LMP1 из опухолевой ткани больных ЛХ (ЛХ-34.1, ЛХ-46.1) и НХЛ (НХЛ-28.1, НХЛ-28.2 и НХЛ-41.3), а также периферической крови больных ИМ (ИМ-2623, ИМ-2624) были изучены на их способность активировать ключевые транскрипционные факторы NF-κB и AP-1, а также индуцибельную форму NO-синтазы (iNOS) и внутриклеточное накопление окиси азота (NO) (таблица).

*Получение полноразмерных низкодивергентных вариантов LMP1 и клеточных линий, постоянно экспрессирующих исследуемые белки.* Наша стратегия получения выбранных полноразмерных вариантов гена *LMP1* была основана на амплификации двух фрагментов каждого гена – N-концевого (836 п.н.) и C-концевого (620 п.н.). При этом 5'-концевая область фрагмента 620 п.н. и 3'-концевая область фрагмента 836 п.н. частично перекрывались и имели общий внутренний сайт рестрикции для эндонуклеазы MscI (BamI), что позволило в дальнейшем использовать его для реконструкции полноразмерных вариантов гена *LMP1*. Все манипуляции по объединению фрагментов в полноразмерный ген проводились в плазмидном векторе pGEM-T Easy (“Promega”). Для определения биологических свойств выбранных низкодивергентных LMP1, исследуемые варианты гена клонировали в эукариотический экспрессирующий вектор pSG5 и в ретровирусный вектор pBabe-пуго.

Варианты гена *LMP1*, клонированные в ретровирусный вектор, упаковывали в клетках Phoenix-ampho, и полученными таким образом ретровирусными стоками трансдуцировали клетки крысиных фибробластов Rat-1. Последующую селекцию клеток, несущих необходимые векторные конструкции, проводили в течение двух недель с добавлением пурамицина. Экспрессию LMP1 во всех полученных стабильных клеточных линиях, подтверждали вестерн-блот-анализом (рис. 2б).

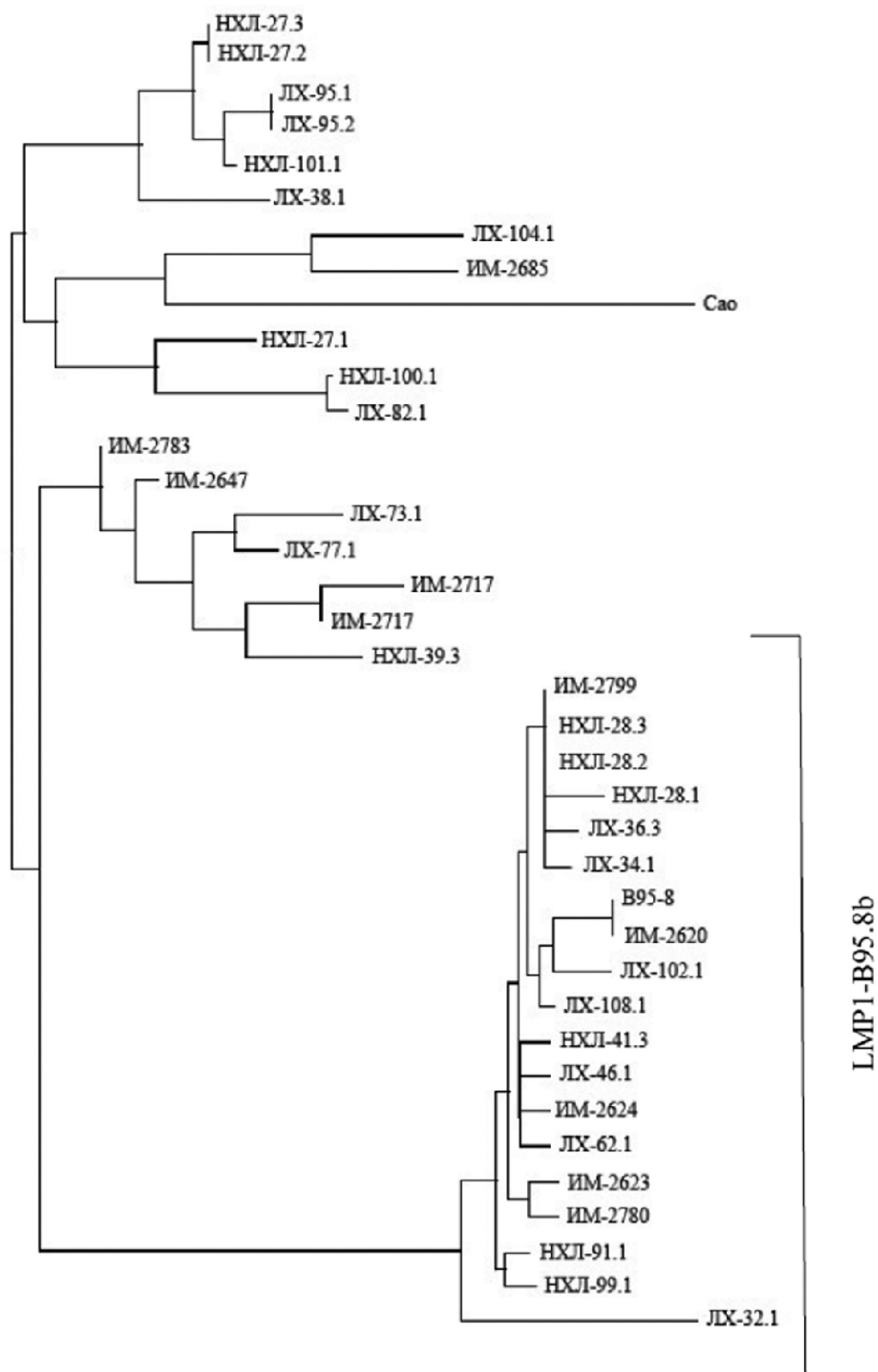
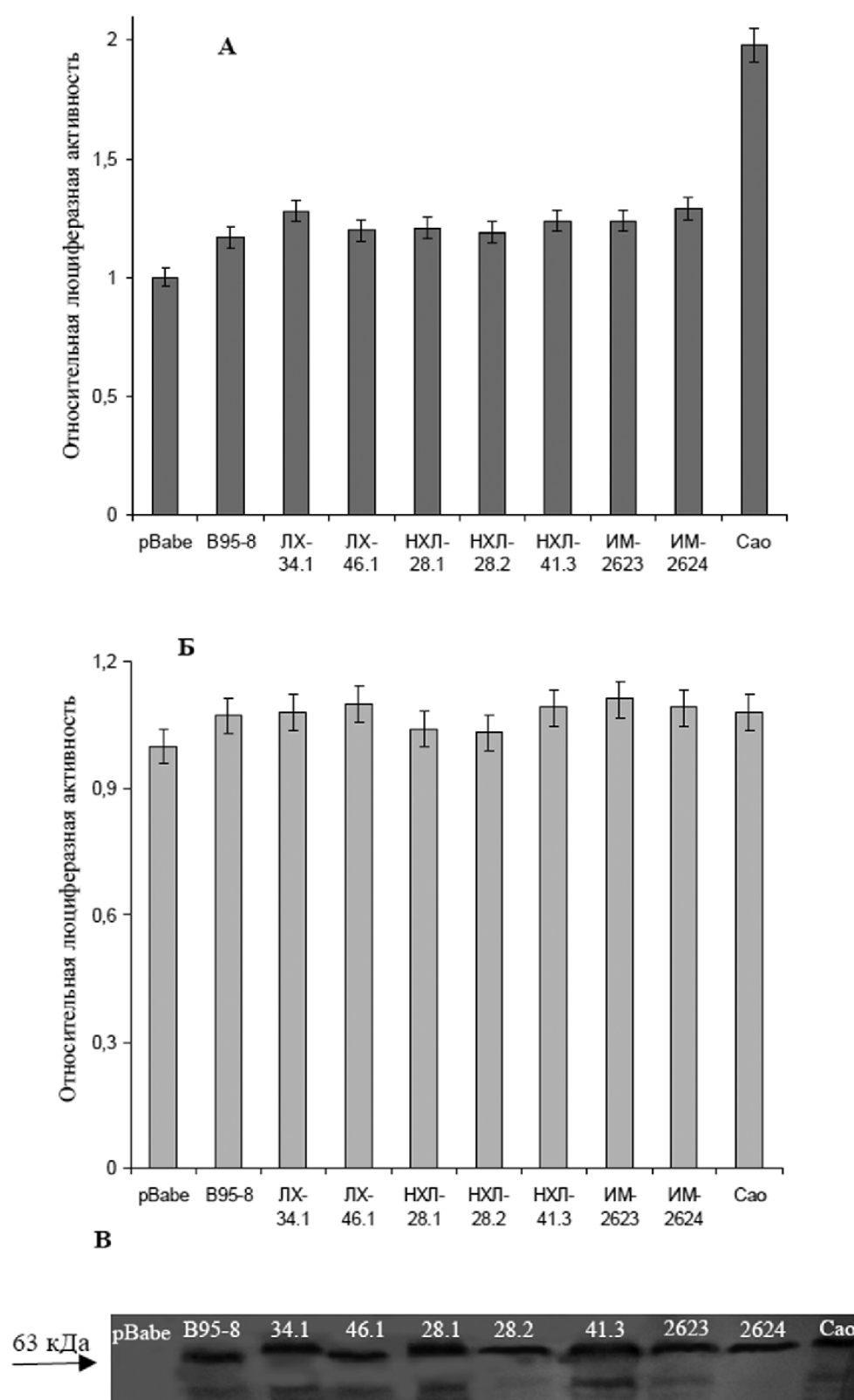


Рисунок 1.

Филогенетическое дерево, построенное методом neighbor-joining по полным аминокислотным последовательностям вариантов LMP1.



**Рисунок 2.**

Активация NF-κB (А) и AP1 (Б) сигнальных путей в клеточных линиях крысиных фибробластов Rat-1, экспрессия вариантов LMP1 (В).

## АНАЛИЗ ЛАТЕНТНОГО МЕМБРАННОГО БЕЛКА 1 ВИРУСА ЭПШТЕЙНА-БАРР

*Таблица.* Аминокислотные замены, присутствующие в исследуемых низкодивергентных вариантах LMP1.

<b>Варианты LMP1</b>	<b>Замены</b>
<b>ЛХ-34.1</b>	<b>F106Y, D210E, E328Q, S366T</b>
<b>ЛХ-46.1</b>	<b>I85L, F106Y, E328Q, G352S, S366T</b>
<b>НХЛ-28.1</b>	<b>W39C, L93V, F106Y, E328Q, S366T</b>
<b>НХЛ-28.2</b>	<b>F106Y, E328Q, S366T</b>
<b>НХЛ-41.3</b>	<b>I85L, A96T, F106Y, E328Q, S366T</b>
<b>ИМ-2623</b>	<b>I85L, F106Y, I122L, L306M, E328Q, S366T</b>
<b>ИМ-2624</b>	<b>I85L, F106Y, S239M, E328Q, S366T</b>

*Мутации низкодивергентных вариантов LMP1* российского происхождения незначительно влияют на активацию транскрипционных факторов NF-κB и AP-1. Как известно, экспрессия белка LMP1 приводит к активации множества клеточных генов, вовлеченных в процессы пролиферации, иммортализации и выживаемости клеток. Индукция многих из этих генов тесно связана с активацией таких ключевых транскрипционных факторов клетки как NF-κB и AP-1. Используя соответствующие люциферазные репортерные векторы, мы проанализировали влияние низкодивергентных вариантов LMP1, полученных от российских больных ЛХ, НХЛ и ИМ, и двух контрольных вариантов LMP1-B95.8 и LMP1-Cao (прототипного и высокотуморогенного, соответственно) на уровне активации NF-κB и AP-1. Как следует из рисунка 2а, экспрессия исследуемых вариантов белка в клетках HEK293 приводит к некоторой активации NF-κB, уровень которой, однако, незначительно (на 5-8%) выше такового, вызванного экспрессией прототипного варианта LMP1-B95.8. При этом значимых различий в активации этого транскрипционного фактора между самими изучаемыми низкодивергентными вариантами LMP1 выявить не удалось. В то же время, уровень активации NF-κB высокотуморогенным LMP1-Cao оказался в 1,83 раза выше таковых, вызванных прототипным вариантом LMP1-B95.8 и исследуемыми вариантами белка.

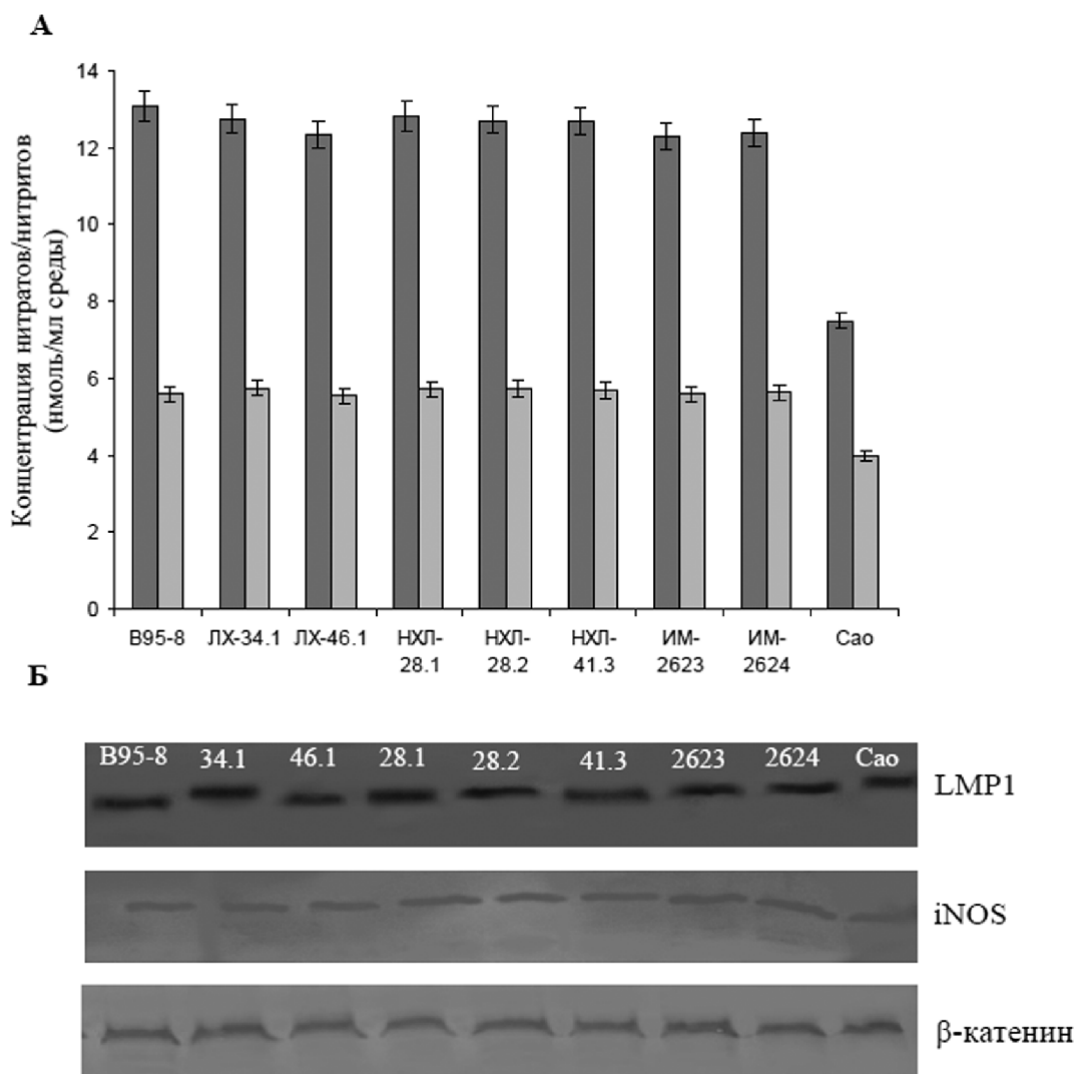
Ранее показано, что активация NF-κB обусловлена взаимодействием адаптерных молекул TRAF с трансактивирующими доменами STAR1 (191-232 а.о.) и STAR2 (351-366 а.о.) белка LMP1 [5, 6]. Как видно из таблицы, в одном из исследуемых нами низкодивергентных вариантов LMP1 (ЛХ-34.1) встречается мутация, замена аспарагиновой кислоты на глутаминовую кислоту (D210E), локализованная в STAR1 домене, однако наличие только одной этой мутации, вероятно, не играет критической роли в активации NF-κB, о чём свидетельствует отсутствие различий между уровнями активации NF-κB у вариантов с наличием этой замены (рис. 2а). Во втором трансактивирующем домене выявлены две аминокислотные мутации G352S и S366T, одна из которых (S366T), наряду с заменами F106Y и E328Q, встречаются во всех исследуемых вариантах LMP1, принадлежащих к LMP1-B95.8b (таблица). Вероятно, наличие этих замен и является причиной незначительного повышения NF-κB при экспрессии исследуемых вариантов LMP1 (рис. 2а).



При изучении транскрипционного фактора *jun/AP1* также обнаружена способность у изучаемых вариантов LMP1 вызывать его активацию (рис. 2б). В то же время статистически значимых различий между исследуемыми вариантами онкобелка, а также между ними и контрольными вариантами выявить не удалось. При определении люциферазной активности наличие экспрессии LMP1 в анализируемых клеточных линиях подтверждали с помощью иммуноблотинга с использованием антител S12, специфичных к области повторов белка (рис. 2в).

Интересно отметить, что активация AP-1 вариантами НЛХ-28.1 и НЛХ-28.2, выделенными из опухоли и смыва из ротоглотки больного НХЛ, соответственно, была ниже на 3,3%, чем таковая у прототипного LMP1-B95.8 (рис. 2б). Ранее показано, что наличие в белке LMP1 замен F106Y и I85L снижает цитотоксичность молекулы белка [15]. В отличие от остальных изучаемых низкодивергентных вариантов, эти два варианта не имели замены I85L. Соответственно цитотоксический эффект от их экспрессии в клетке может быть выше, чем при экспрессии исследуемых вариантов LMP1 с указанными двумя мутациями, что возможно нашло свое отражение в снижении уровня активации AP-1 вариантами НЛХ-28.1 и НЛХ-28.2. Экспрессия же остальных низкодивергентных LMP1, изолированных из опухолевой ткани больных ЛХ, НХЛ и периферической крови больных ИМ, а также экспрессия контрольных вариантов прототипного LMP1-B95.8 и высокотуморогенного LMP1-Сао, вызывала сходный уровень активации AP-1, что, вероятно, не отражает онкогенный потенциал исследуемых вариантов LMP1. Таким образом, отсутствие значимых различий в активации AP-1 между изученными вариантами LMP1, различной степени дивергентности, отличающихся по набору мутаций, по-видимому, свидетельствует о том, что они не играют критической роли в этом процессе. В то же время, существование природных вариантов LMP1, способных активировать этот транскрипционный фактор в независимости от замен в доменах этого белка, наводит на предположение о существовании дополнительных факторов, влияющих на активацию AP-1 [30]. Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод о том, что минимальный набор мутаций в исследуемых вариантах вирусного белка, по-видимому, не играет критической роли в изменении активности транскрипционных факторов NF- $\kappa$ B и AP-1.

*Экспрессия низкодивергентных вариантов LMP1 приводит к активации iNOS и незначительному снижению уровня NO в клетках крысиных фибробластов Rat-1.* Известно, что в индукции iNOS белком LMP1 ключевую роль играют транскрипционные факторы NF- $\kappa$ B и STAT3. Более того, ранее показанные различия в активации iNOS и уровнях внутриклеточной генерации NO между отдельными вариантами LMP1 позволяют нам предположить влияние мутаций LMP1 на этот процесс [20, 31]. Для определения значения ограниченного числа замен исследуемых вариантов LMP1 в индукции образования оксида азота, мы анализировали линии Rat-1, постоянно экспрессирующие изучаемые низкодивергентные онкобелки LMP1, а также контрольные варианты LMP1-B95.8 и LMP1-Сао. С этой целью в 3-дневной культуральной среде исследуемых клеток Rat-1 измеряли концентрацию конечных продуктов нитратов и нитритов. Как видно на рисунке 3а, количество выделяемого в культуральную среду NO клетками, экспрессирующими исследуемые варианты LMP1 российского происхождения, было несколько ниже по сравнению с прототипным вариантом LMP1-B95.8, но не снижалось до уровня NO, выделяемого клетками, экспрессирующими высокотуморогенный вариант LMP1-Сао. Так, при экспрессии вариантов ИМ-2623, ИМ-2624 и ЛХ-46.1 наблюдалось снижение уровня накопления NO на 4,6-5,4% по сравнению с экспрессией прототипного LMP1-B95.8, хотя при экспрессии других низкодивергентных вариантов (ЛХ-34.1, НЛХ-28.1, НЛХ-28.2, НЛХ-41.3) это различие было не столь значительным.



**Рисунок 3.**

Индукция iNOS и накопление NO при экспрессии вариантов LMP1: А - накопление нитритов/нитратов в культуральной среде клеточных линий Rat1, экспрессирующих варианты LMP1. Тёмные колонки - без добавления дексаметазона, светлые - с добавлением дексаметазона. Б - Вестерн-блот-анализ с использованием антител, специфичных к LMP1 (S12), iNOS (NOS-20) и β-катенину. β-Катенин использовался в качестве контроля нанесения.

Для подтверждения участия в индукции внутриклеточного синтеза NO индуцибельной формы NO-синтазы (iNOS), мы использовали специфические антитела к iNOS (рис. 3б), а также дексаметазон (Dex), который является ингибитором этой формы фермента. Как следует из рисунка 3а, обработка в течение трех дней этим ингибитором клеток, экспрессирующих разные варианты LMP1, ведет к снижению синтеза NO: в случае прототипного варианта – на 60%, при экспрессии низкодивергентных вариантов – на 52-55%, а в случае Cao – на 46% ( $p < 0,001$ ). Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод об определённом влиянии даже небольшого набора мутаций (характерных для преобладающих в России вариантов LMP1) на уровень активации iNOS и внутриклеточное образование NO и, соответственно, на степень туморогенности вариантов LMP1.

Известно, что экспрессия белка LMP1 вызывает активацию транскрипционного фактора NF-κB, который играет ключевую роль в воспалительных процессах и регуляции индукции iNOS в клетке. В то же время, в нашем исследовании мы не наблюдали значимой активации NF-κB низкодивергентными вариантами белка LMP1, в отличие от активации его высокотуморогенным LMP1-Сао. Учитывая этот факт, можно предположить, что выявленная нами индукция iNOS и накопление NO, наблюдаемые при экспрессии исследуемых вариантов LMP1, может осуществляться другим путём, через рецептор EGFR и транскрипционный фактор STAT3 [32]. Возможно, однако, что существуют и другие факторы, участвующие в этом сложном механизме, что требует проведения дальнейших исследований.

Таким образом, филогенетический анализ вариантов LMP1 российских больных ВЭБ-ассоциированными лимфопролиферативными заболеваниями позволил выделить в качестве доминирующей монофилетическую группу, относящуюся к низкодивергентному штамму LMP1-B95.8b. Впервые выполненный у представителей этой группы функциональный анализ позволил обнаружить у них сходство биологических свойств, несмотря на их различное клиническое происхождение: от больных злокачественными (ЛХ, НЛХ) и доброкачественными (ИМ) патологиями. Так, экспрессия изучаемых вариантов LMP1 в эмбриональных клетках почки человека HEK293 сопровождалась незначительным усилением активации транскрипционного фактора NF-κB и не оказывала существенного влияния на активацию транскрипционного фактора AP-1. В то же время, все исследуемые варианты LMP1 в клетках Rat-1 вызывали активацию индуцибельной NO-синтазы (iNOS), приводящую к продукции в клетках окиси азота (NO), уровень накопления которой оказался незначительно ниже такового, вызванного прототипным низкотрансформирующим вариантом LMP1-B95.8. Полученные данные позволяют предположить, что в патологических процессах, связанных с возникновением указанных лимфопролиферативных заболеваний, кроме умеренной активации транскрипционного фактора NF-κB и индукции iNOS, вызываемых низкодивергентными вариантами LMP1 ВЭБ, принимают участие и другие факторы. Расширение и углубление этих исследований, вероятно, позволит приблизиться к пониманию механизма канцерогенеза, осуществляемого низкодивергентными вариантами LMP1.

Работа осуществлялась при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 07-04-00604-а).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kaye K.M., Izumi K.M., Kieff E. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 9150-9154.
2. Moorthy R.K., Thorley-Lawson D.A. (1993) *J. Virol.*, **67**, 1638-1646.
3. Kulwichit W., Edwards R.H., Davenport E.M., Baskar J.F., Godfrey V., Raab-Traub N. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 11963-11968.
4. Fennewald S., van Santen V., Kieff E. (1984) *J. Virol.*, **51**, 411-419.
5. Cahir-McFarland E.D., Izumi K.M., Mosialos G. (1999) *Oncogene*, **18**, 6959-6964.
6. Wu L., Nakano H., Wu Z. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 2162-2169.
7. Eliopoulos A.G., Young L.S. (1998) *Oncogene*, **16**, 1731-1742.
8. Eliopoulos A.G., Blake S.M., Floettmann J.E., Rowe M., Young L.S. (1999) *J. Virol.*, **73**, 1023-1025.
9. Lam N., Sagden B. (2003) *Cell. Signal.*, **15**, 9-16.
10. Dawson C.W., Tramontanis G., Eliopoulos A.G., Young L.S. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 3694-3704.

11. Coffin W.F., Erickson K.D., Hoedt-Miller M., Martin J.M. (2001) *Oncogene*, **20**, 5313-5330.
12. Walling D.M., Shebib N., Weaver S.C., Nichols C.M., Flaitz C.M., Webster-Cyriaque J. (1999) *J. Infect. Dis.*, **179**, 763-764.
13. Hu L.F., Zabarovsky E.R., Chen F., Cao S.L., Emberg I., Klein G., Winberg G. (1991) *J. Gen. Virol.*, **72**, 2399-2409.
14. Edwards R.H., Seiller-Moiseiwitsch F., Raab-Traub N. (1999) *Virology*, **261**, 79-95.
15. Nitta T., Chiba A., Yamamoto N., Yamaoka S. (2004) *Cell. Signal.*, **16**, 1071-1081.
16. Павлиш О.А., Дидук С.В., Смирнова К.В., Щербак Л.Н., Гончарова Е.В., Шалгинских Н.А., Архипов В.В., Кичигина М.Ю., Степина В.Н., Белоусова Н.В., Османов Е.А., Яковлева Л.С., Гурцевич В.Э. (2008) *Вопр. вирусологии*, **53**, 10-16.
17. Sandvej K., Peh S.C., Andresen B.S., Pallesen G. (1994) *Blood*, **84**, 4053-4060.
18. Nathan C. (1992) *FASEB. J.*, **6**, 3051-3064.
19. Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A. (1991) *Pharmacol. Rev.* **43**, 109-142.
20. Yu J.S., Tsai H.S., Wu C.C., Weng L.P., Li H.P., Chung P.J., Chang Y.S. (2002) *Oncogene*, **21**, 8047-8061.
21. Edwards R.H., Seiller-Moiseiwitsch F., Raab-Traub N. (1999) *Virology*, **261**, 79-95.
22. Sandves K., Gratama J.W., Munch M., Zhou X.G., Bolhuis R.L., Andresen B.S., Gredersen N., Hamilton-Dutoit S. (1997) *Blood*, **90**, 323-330.
23. Edwards R.H., Sitki-Green D., Moore D.T., Raab-Traub N. (2004) *J. Virol.*, **78**, 868-881.
24. Thomson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. (1997) *Nucl. Acid. Res.*, **24**, 4876-4882.
25. Saitou N., Nei M. (1987) *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406-425.
26. Van de Peer Y., de Wachter R. (1994) *Comput. Applic. Biosci.*, **10**, 569-570.
27. Felsenstein J. (1985) *Evolution*, **39**, 783-791.
28. Bradford M.M. (1976) *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
29. Tang W., Pavlish O.A., Spiegelman V.S., Parkhitko A.A., Fuchs S.Y. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 48942-48949.
30. Fielding C.A., Sandvej K., Mehl A., Brennan P., Jones M., Rowe M. (2001) *J. Virol.*, **75**, 9129-9141.
31. Дидук С.В., Смирнова К.В., Павлиш О.А., Гурцевич В.Э. (2008) *Биохимия*, **73**, 1414-1421.
32. Ma N., Kawanishi M., Hiraku Y., Murata M., Huang G.W., Huang Y., Luo D.Z., Mo W.G., Fukui Y., Kawanishi S. (2008) *Int. J. Cancer*, **122**, 2517-2525.

Поступила: 28. 04. 2009.

**FUNCTIONAL ANALYSIS OF EPSTEIN-BARR VIRUS LATENT MEMBRANE PROTEINS (LMP1) IN PATIENTS WITH LIMPOROLIFERATIVE DISORDERS**

*K.V. Smirnova, S.V. Diduk, V.E. Gurtsevitch*

N.N.Blokhin Cancer Research Center, RAMS, Kashirskoe shosse, 24, Moscow, Russia;  
tel.: (495) 324-25-64; fax: (495)3241205, e-mail: gurtsevitch@crc.umos.ru

Latent membrane protein1 (LMP1) encoded by the *LMP1* gene of the Epstein-Barr virus (EBV) is a transmembrane protein, which can activate a number of cellular signal cascades and transcriptional factors leading to cell transformation. In the present study the sequencing of full-length *LMP1* variants isolated from Russian patients with Hodgkin's lymphoma (HL), non-Hodgkin's lymphomae (NHL) and infectious mononucleosis (IM) has been carried out. The phylogenetic analysis of obtained sequences revealed dominance of the LMP1 variants belonging to proteins of low-divergent group LMP1-B95.8b characterized by minimal set of mutations. Investigation of biological properties in the Russian representatives of this group revealed that expression of studied LMP1 variants in embryonic kidney 293 cells was accompanied by insignificant increase in transcriptional factor NF- $\kappa$ B activation and had minor influence on activation of transcriptional factor AP-1. It was also detected that all investigated low-divergent LMP1 variants expressed in Rat-1 cells induced activation of inducible NO-synthase (iNOS) and intracellular production of nitric oxide (NO). At the same time the level of NO accumulation was lower than that induced by the low-transforming prototype variant LMP1-B95.8. The data obtained indicate that the LMP1 variants, which are the most common among Russian patients with EBV-associated lymphoproliferative diseases, are characterized by minimum number of mutations and rather low ability to activate basic cellular signaling pathways regardless the nature of pathological process, benign (IM) or malignant (HL, NHL). It is suggested that in addition to the modest activation of NF- $\kappa$ B and iNOS induction by LMP1 other factors are involved in the cell transformation process.

**Key words:** Epstein-Barr virus, LMP1 protein, NF- $\kappa$ B, NO, iNOS.