

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 578.825.13:578.54.1.083-2

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

ПОЛИМОРФИЗМ ОНКОГЕНА LMP1 ВИРУСА ЭПШТЕЙНА—БАРР У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ КОРЕННОГО МАЛОЧИСЛЕННОГО НАРОДА ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА РОССИИ

ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина Минздрава России, 115478, г. Москва, Россия, Каширское шоссе, д. 24

Механизм возникновения ассоциированных с ВЭБ злокачественных и доброкачественных патологий человека в неэндемичных регионах до сих пор остается не выясненным. Исследование этой проблемы в России, неэндемичной для ВЭБ-ассоциированных заболеваний стране, является актуальной задачей в связи с разнообразием этносов, населяющих различные климатогеографические регионы страны. Особый интерес представляют поиски генетических особенностей штаммов ВЭБ, персистирующих у коренных народов России, в частности, её малочисленных представителей, заселяющих территорию страны с исторических времен.

Известно, что вирус Эпштейна—Барр (ВЭБ) ассоциирован с рядом новообразований человека различной этиологии. При этом уникальной особенностью ВЭБ является полиморфизм его основного онкогена — латентного мембранного белка 1 (LMP1), кодируемого одноименным геном LMP1. Важность изучения генетических перестроек в этом гене базируется на влиянии определённых мутаций, делеций и/или вставок на активность ключевых внутриклеточных молекул, таких как NF-κB, AP-1, iNOS и ряда других, приводящих к малигнизации клетки. Учитывая вышесказанное, наши исследования были сфокусированы на сравнительном анализе полиморфизма LMP1 ВЭБ у коренного населения Хабаровского края (нанайцев) и переселенцев из европейской части страны в данный регион, который не является эндемичным для ВЭБ-ассоциированных патологий, но находится на границе с эндемичными по ВЭБ-ассоциированной форме рака носоглотки южными провинциями Китая. Полученные результаты убедительно показали, что образцы LMP1 штаммов вируса, инфицирующих у нанайцев и переселенцев, по своим последовательностям близки к описанным ранее в литературе вариантам LMP1 из различных регионов мира, но обладают рядом уникальных мутационных особенностей.

Ключевые слова: вирус Эпштейна—Барр (ВЭБ); латентный мембранный белок 1 (LMP1); полиморфизм; мутация; филогенетический анализ.

Для цитирования: Смирнова К.В., Дидук С.В., Гурцевич В.Э. Полиморфизм онкогена LMP1 вируса Эпштейна—Барр у представителей коренного малочисленного народа Дальнего Востока России. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 2017; 22(5): 239-247. DOI: 10.17816/EID40992

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

POLYMORPHISM OF EPSTEIN—BARR VIRUS LMP1 ONCOGENE IN NANAIANS, REPRESENTATIVES OF INDIGENOUS MINORITY OF THE RUSSIAN FAR EAST

N.N. Blokhin National Medical Cancer Research Center, 24, Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

The mechanism of EBV-associated malignant and benign human pathologies in non-endemic regions is still not elucidated. The investigation of this problem in Russia, the country, non-endemic for EBV-associated diseases, is of a special importance due to the variety of ethnic groups inhabiting different geographic and climatic regions. The search for genetic peculiarities of EBV strains persisting in indigenous peoples of Russia, especially, in its minority representatives occupying the country since historical times is of the particular interest. Epstein—Barr virus (EBV) is known to be associated with a number of human tumors of lymphoid and epithelial cell origin. This unique feature of EBV is polymorphism of its main oncogene — latent membrane protein 1 (LMP1), encoded by a gene of the same name LMP1. The importance of the studying of genetic mutations (deletions, insertions and other) in this gene is based on the influence of his certain mutations on the activity of such key intracellular molecules as NF-κB, AP-1, iNOS, and several others, leading to cell malignancy. With bearing it in mind, our study has been focused on the comparative analysis of the LMP1 EBV polymorphism among the indigenous population of the Khabarovsk Territory (Nanai) and immigrants from the European part of the country to this region, which is not endemic for EBV-associated pathologies, but is located on the border with endemic EBV-associated form of nasopharyngeal carcinoma in southern provinces of China. The results obtained clearly showed sequences of LMP1 samples of the virus strains infecting Nanai and immigrants in the Khabarovsk Territory to be similar to LMP1 variants from different parts of the world previously described in the literature and have a number of unique mutation features.

Key words: Epstein—Barr virus (EBV); latent membrane protein 1 (LMP1); polymorphism; mutation; phylogenetic analysis.

For citation: Smirnova K.V., Diduk S.V., Gurtsevitch V.E. Polymorphism of Epstein-Barr Virus LMP1 oncogene in nanaians, representatives of indigenous minority of the Russian Far East. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni. Epidemiology and infectious diseases (Russian Journal).* 2017; 22(5): 239-247. (In Russ.). DOI: 10.17816/EID40992

For correspondence: Ksenia V. Smirnova, MD, PhD, senior researcher of the Laboratory of Viral Carcinogenesis of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Cancer Research Center, 24, Kashirskoe shosse, 115478 Moscow, Russia

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement. The study was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research in the frameworks of research projects No. 14-04-01810a and No. 15-34-70031mil_a_mos.

Received 20.10.2017

Accepted 22.11.2017

Для корреспонденции: Смирнова Ксения Валерьевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина Минздрава России, E-mail: skv.lab@yandex.ru

Введение

Доказано, что вирус Эпштейна—Барр (ВЭБ), убиквитарно распространенный среди населения земного шара, также ассоциирован с целым спектром доброкачественных и злокачественных новообразований. К числу последних относят рак носоглотки (РНГ), лимфому Беркита, определенные гистологические варианты лимфомы Ходжкина, рака желудка и целый ряд других [1]. Важно отметить, что в различных географических регионах мира и этнических группах выявлены варианты ВЭБ, в ключевых генах которых обнаружены определенные наборы мутаций (замены, вставки и делеции), влияющие на их трансформирующие свойства и онкогенный потенциал. К числу функционально важных генов, с которыми связан трансформирующий и онкогенный потенциал ВЭБ, относится латентный мембранный белок 1 (*LMP1*), обладающий выраженным полиморфизмом [2]. Являясь мультифункциональным геном ВЭБ, его признанным онкогеном, *LMP1* участвует в индукции целого ряда транскрипционных факторов (NF-κB, AP-1, STAT), оказывая влияние на изменение профиля внутриклеточной активности ряда сигнальных путей, что приводит к трансформации инфицированной клетки [3]. Показано, что уровень индукции различных сигнальных каскадов клеток часто зависит от определенных мутаций в последовательности этого онкогена [4].

Молекулярный анализ *LMP1* различного клинического и географического происхождения позволил обнаружить генетические варианты гена, отражающие в ряде случаев их неодинаковую биологическую активность. Так, вариант *LMP1*, амплифицированный более 20 лет тому назад от больного раком носоглотки (РНГ) из Южных провинций Китая, региона эндемичного для этого новообразования, содержал делецию 30 пар нуклеотидов (п.н.) в С-терминальной области и кодировал соответствующий делетированный вариант белка (*LMP1*) [5]. Этот вариант *LMP1*, названный «Сао», проявлял выраженные трансформирующие свойства *in vitro* и оказался более туморогенным для мышей с выраженным комбинированным иммунодефицитом (SCID) по сравнению с *LMP1* стандартного варианта ВЭБ, штамма B95.8 [6]. Опыты по трансфекции на клетках линии BALB/3T3 также подтвердили более высокий туморогенный потенциал *LMP1*-Сао по сравнению с *LMP1*-B95.8 [7]. Повышенную трансформирующую активность изолята *LMP1*-Сао связывают с наличием в его С-терминальной области делеции 30 п.н., которая ответственна за усиленную индукцию NF-κB. Позже было обнаружено, что штаммы ВЭБ, содержащие делетированные варианты *LMP1*, не только широко распространены в регионах, эндемичных для РНГ, но также встречаются и в других

не эндемичных регионах мира. Более того, делетированные варианты *LMP1* были амплифицированы из опухолевых клеток больных некоторыми ВЭБ-ассоциированными новообразованиями лимфоидного происхождения и даже здоровых лиц [8—10].

Проведенное нами ранее исследование, свидетельствует о том, что среди населения центрально-европейской части России доминирует штамм ВЭБ с низкодивергентным вариантом *LMP1*-B95.8, обладающий низкой трансформирующей активностью [11—13]. Какие штаммы ВЭБ и варианты *LMP1* персистируют среди населения восточного региона России с большим числом малочисленных этносов — вопрос, который до сих пор остается не изученным. В этом плане представляют интерес проведение исследования среди одного из представителей коренного малочисленного народа Дальнего Востока, нанайцев, проживающих в Хабаровском крае по берегам Амура и его притоков. Важно отметить, что до массового заселения Дальнего Востока из центральных регионов России, где, как уже было упомянуто, преобладают низкодивергентные варианты ВЭБ, эта этническая группа локально размещалась на юго-восточных территориях РФ и восточных провинциях Китая, где могла быть инфицирована локальными штаммами этого вируса. Еще одной особенностью этой этнической группы является их низкая продолжительность жизни, которая к концу семидесятых годов прошлого века составляла 44 года, хотя в 80-е годы произошло некоторое повышение этого показателя. Рак, как известно, заболевание людей пожилого возраста, и при низкой продолжительности жизни ВЭБ обычно не успевает проявить свои онкогенные потенциалы.

Исходя из вышесказанного, данное исследование впервые посвящено изучению полиморфизма *LMP1* ВЭБ у коренного населения (нанайцев) и иммигрантов данного региона, который не является эндемичным для ВЭБ-ассоциированных патологий, но находится на границе с эндемичными по РНГ южными провинциями Китая. Полученные нами результаты убедительно показали, что российские образцы *LMP1* по своим последовательностям близки к описанным ранее в литературе вариантам *LMP1* из различных регионов мира, но обладают рядом уникальных мутационных особенностей.

Материалы и методы

Изучаемые группы и образцы ДНК

В исследовании участвовало две группы населения Хабаровского края Дальнего Востока РФ. Одна группа состояла из 19 представителей коренного населения, нанайцев: 9 мужчин (47,4%) и 10

женщин (52,6%). Возраст вошедших в эту группу лиц колебался от 24 до 58 лет (медиана — 45,7 лет). Другая группа, состоящая из 28 лиц (мужчин 13, 46%; женщин 15, 54%), представляла собой иммигрантов Дальнего Востока из европейской части РФ. В эту группу вошли жители г. Комсомольска-на-Амуре, представители славянских народов России. Возраст вошедших в эту группу лиц колебался от 28 до 63 лет (медиана — 46,1 лет). Материалом для исследования служили образцы крови и смывов ротоглотки. Из собранных образцов биологического материала была экстрагирована ДНК, используя набор Проба-НК (ДНК-диагностика). Наличие ДНК подтверждали методом ПЦР с соответствующей парой праймеров к области гена GAPDH.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

На следующем этапе каждый образец ДНК изучали на присутствие гена *LMP1* с помощью «гнездовой» ПЦР, используя соответствующие пары праймеров: внешние — Eco3': 5'-TCCAGGAGAATTCCCCATCTCGAGAGTG-3' и 8785: 5'-CGACCCCAATCTGGATGTATTATTATGG-3'; и внутренние — Bam3': 5'-GTTTTTCGTGGATCCTTATACAGTA-3' и 8702: 5'-GCTACCGATTCTGGCCATGAATCTGAC-3', как было описано ранее [11].

Секвенирование

Для секвенирования амплифицированных образцов *LMP1* использовали метод, описанный Edwards и соавт., (1999) с небольшими модификациями [14]. Исследование 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, Vector NTI и Mega v. 2.1.

Классификация *LMP1*

Полученные варианты *LMP1* анализировали в соответствии с предложенными ранее классификациями [15—17].

Филогенетический анализ

Полученные последовательности гена *LMP1* ВЭБ с использованием компьютерной программы Vector NTI транслировались в аминокислотные последовательности, после чего проводили филогенетический анализ. Для построения филогенетического древа использовался метод «ближайших соседей» (neighbor-joining, Кимура 2-параметр) с использованием программы MEGA v.2.1. В качестве контрольных последовательностей использовались последовательности прототипного низкодивергентного *LMP1*-B95-8 и высокотуморогенного *LMP1*-Сао, полученные из открытых баз данных PubMed и GenBank.

Статистический анализ

Точный тест Фишера был использован для сравнения достоверности различий между процентным содержанием вариантов *LMP1* в биологических образцах двух сравниваемых групп. Значения p менее 0,05 ($p < 0,05$) указывало на наличие существенных различий.

Результаты и обсуждение

Тестирование образцов крови и смывов ротоглотки на присутствие ДНК вируса Эпштейна-Барр, проведенное при предварительном исследовании, показало, что у представителей коренного населения (нанайцев), и у иммигрантов, инфицированность ВЭБ составила 100%.

Филогенетический анализ

Используя экстрагированную ДНК ВЭБ, нами проведена амплификация и секвенирование образцов С-терминальной области онкогена *LMP1*. Анализ нуклеотидных и транслированных аминокислотных последовательностей полученных ампликонов выявил их некоторую вариабельность. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей полученных образцов *LMP1* позволил подтвердить их гетерогенность (рисунок 1). Ни для одной из сравниваемых групп населения не выявлено преобладание B95.8/A генотипа *LMP1*, доминирующего у жителей Европейской части РФ и характеризующегося низким уровнем дивергенции — 3—4-мя критическими заменами а.к. по сравнению с прототипным вариантом *LMP1*-B95-8. Следует также отметить, что доминирование низкодивергентной группы *LMP1*-B95.8A отмечено только на территории европейской части России [11], в остальных странах мира представители этой группы встречаются спорадически, а преобладающее число исследованных вариантов *LMP1* относится к высокодивергентным вариантам China1, NC, Med+, Med- и ряду других [14]. В проведенном исследовании, все изучаемые варианты *LMP1* ВЭБ были равномерно распределены между известными в литературе низко (B95.8/A) и высокодивергентными вариантами *LMP1* Med+, Med-, China1 и NC, при этом такие варианты как China2, China3 и Alaskan отсутствовали.

Классификация вариантов *LMP1* ВЭБ

Результаты классификации образцов *LMP1* от представителей двух изучаемых групп представлены в табл. 1. Из таблицы следует, что набор вариантов *LMP1* и их процентное содержание у аборигенов и иммигрантов был практически одинаковым. При этом низкодивергентный вариант B95.8 в каждой группе составил примерно 1/4 часть от числа всех зарегистрированных вариантов. Процентное же содержание высокодивергентного варианта China1, соответствующего китайскому варианту Сао, для которого характерен большой спектр

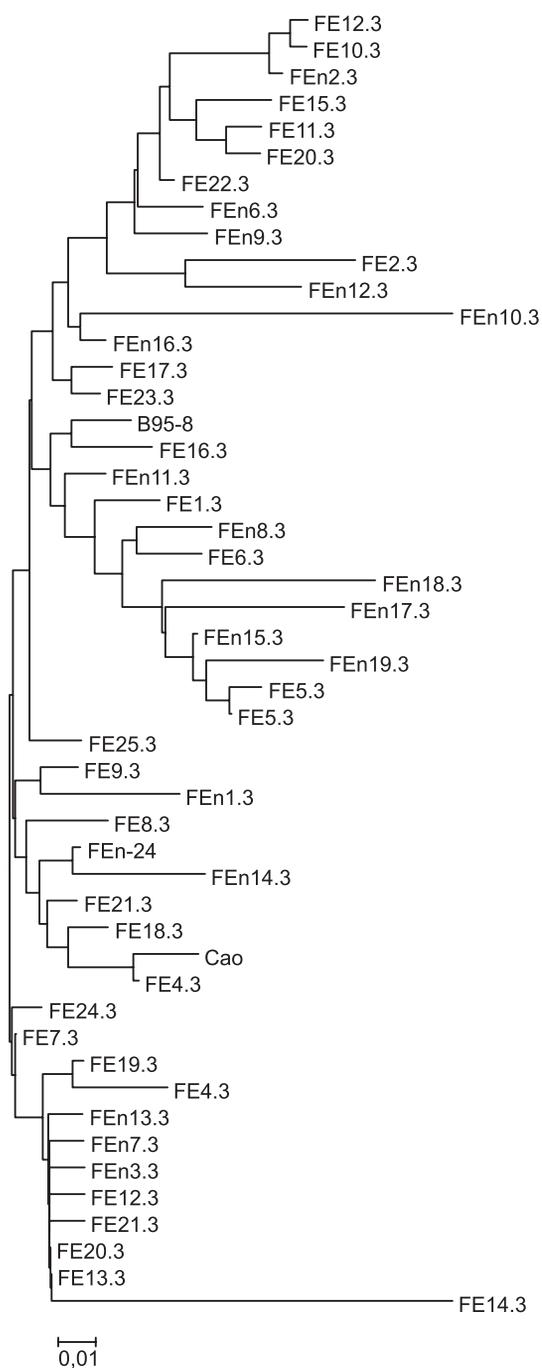


Рис. 1. Филогенетическое древо, построенное на основании сравнения аминокислотных последовательностей вариантов *LMP1* ВЭБ российского происхождения, полученных от коренных жителей дальнего востока России (FEn) и иммигрантов для данного региона (FE), с прототипным *LMP1*-B95.8 и высокотуморогенным *LMP1*-Cao (метод «ближайших соседей» (Кимура 2-параметр) с использованием программы MEGA v.2.1).

мутаций и выраженный трансформирующий потенциал, хотя и был несколько выше в группе иммигрантов, чем в группе нанайцев (21.4%; 6/28 против 15.8%; 3/19), различие между этими показателями оказалось статистически недостоверным

($p < 0.001$). Содержание других вариантов онкобелка (Med+, Med-, NC) в сравниваемых группах также различалось незначительно и статистически недостоверно.

Анализ полученных данных показал, что ни один из исследованных образцов *LMP1* не содержал высоко трансформирующую Cap-подобную делецию 30 п.н., характерную для вариантов *LMP1* у больных нРНГ из южных провинций Китая и стран Юго-Восточной Азии, часто встречающуюся среди здорового населения этих регионов [5].

Спектр генотипических вариантов *LMP1*, выявляемых у аборигенов и иммигрантов Хабаровского края, а также населения европейской части России, в сопоставлении с таковым у населения различных регионов мира, представлены в табл. 2. Из таблицы видно, что для населения стран Азии и Северной Америки характерно широкое распространение штамма ВЭБ, кодирующего высокотуморогенный вариант онкобелка Cao/China1 (82.5% и 66.0% соответственно). Эти показатели контрастируют с отсутствием указанного штамма вируса у европейцев, невысокой его встречаемостью у россиян европейской части России (9.5%), а также у аборигенов и иммигрантов Хабаровского края (15.8% и 21.4% соответственно). Широкое распространение ВЭБ с высоко туморогенным вариантом *LMP1*-China1 среди населения южных провинций Китая и стран Юго-восточной Азии является, по-видимому, важной [18], но не единственной причиной высокого уровня заболеваемости РНГ в этих странах. Играя роль пускового фактора в возникновении этого новообразования, ВЭБ для реализации онкогенных потенций нуждается в содействии ряда дополнительных факторов, одним из которых является генетическая предрасположенность лиц к РНГ, их определённый HLA гаплотип [19, 20]. Доказанными факторами риска возникновения РНГ также являются: употребление в пищу консервированных продуктов в раннем возрасте, содержащих нитраты и нитрозамины [21], курение сигарет и профессиональное воздействие формальдегида и древесной пыли [22]. Содержание низкодивергентного и низкотуморогенного варианта *LMP1* B95.8 среди населения указанных регионов (табл. 2) также существенно различалось.

Наиболее высокий процент этого варианта онкобелка зарегистрирован среди населения Европейской части России (78.9%), что коррелирует с низкой заболеваемостью РНГ в стране — 0.14% у мужчин и 0.06% у женщин от числа всех зарегистрированных солидных новообразований в 2012 г. [23]. Среди населения Европы и Северной Америки частота обнаружения низкодивергентного варианта *LMP1* B95.8 была практически вдвое ниже (42% и 33% соответственно), чем у жителей Европейской части России и, например, до чет-

Таблица 1

Варианты онкобелка LMP1, выявленные у представителей коренного (нанайцев) населения и иммигрантов Хабаровского края.

Изучаемые группы населения Хабаровского края	Варианты <i>LMP1</i>				
	B95.8/A (%)	China1 (%)	Med+ (%)	Med- (%)	NC (%)
Нанайцы	5	3	4	4	3
<i>n</i> = 19	26,2%	15,8%	21,1%	21,1%	15,8%
Мигранты	7	6	4	5	6
<i>n</i> = 28	25,0%	21,4%	17,9%	14,3%	21,4%
Всего	12	9	8	9	9

верти ниже среди аборигенов и иммигрантов Хабаровского края (26.2% и 25.0% соответственно). Учитывая высокую этническую и национальную гетерогенность населения Европы и США, связать уровни распространенности *LMP1* B95.8 в этих странах с показателями заболеваемости РНГ не представляется возможным. Интересно отметить, что варианты *LMP1* China 2, China 3 и Alaskan у лиц сравниваемых групп, как и среди россиян, полностью отсутствовали. Объединённый генотип *LMP1* Med, состоявший из генотипов Med+ и Med- (содержавших и не содержащих делецию 10 а.к. соответственно), встречался среди изучаемых групп населения примерно с одинаковой частотой, за исключением низкого его содержания среди населения Европейской части России. Генотип *LMP1* NC, отсутствующий у населения Азиатских стран и Северной Америки, у населения Европы и обеих групп Хабаровского края был невысоким и колебался от 18% до 21.4%, и составил 10.5% у населения Европейской части России [13].

Аминокислотные замены в последовательности LMP1 ВЭБ

Сравнительный анализ транслированных аминокислотных последовательностей *LMP1*, характерных для штаммов ВЭБ, персистирующих у представителей коренного населения (нанайцев) и иммигрантов Хабаровского края, представлен в

табл. 3. Результаты анализа позволяют сделать вывод о достаточно высокой степени генетического родства анализируемых образцов *LMP1*, хотя обнаружены и некоторые отличия. В частности, неожиданным стало выявление образца FEn14.3, полученного от представителя коренного населения, содержащего вариант *LMP1* со специфической мутацией в 212-м положении (глицин на серин, G212S), сопровождающей «Сао» делецию. Эта мутация приходится на первый сайт распознавания HOS-белков (одного из компонентов E3-лигазы, участвующего в процессинге молекулы IκB — супрессора NF-κB). В то же время абсолютно все варианты *LMP1* ВЭБ из тестируемых нами образцов биологического материала имели характерную для Сао-вариантов *LMP1* замену в 366-м (серин на треонин) положении. Кроме того, в ряде вариантов *LMP1* из обеих анализируемых групп удалось выявить дополнительные Сао-специфические мутации, например, замену глутамина на аргинин в 334-й позиции (Q334R). Вместо типичной для Сао-варианта *LMP1* ВЭБ замены в 328-м положении глутаминовой кислоты на аланин (E328A) в изученных нами образцах *LMP1* мы выявили модифицированную замену в том же положении глутаминовой кислоты на глутамин (E328Q). При этом данная замена не является типичной для европейских образцов, но распространена среди

Таблица 2

Распространение вариантов LMP1 у неонкологических больных/доноров крови в различных географических регионах мира.

Генотип <i>LMP1</i>	Азия*	Северная Америка*	Европа*	Европейская часть России**	Аборигены Хабаровского края (нанайцы)	Мигранты Хабаровского края (славяне)
China 1	70.0%	33.0%	27.0%	5.3%	15.8%	21.4%
China 2	0.0%	0.0%	0.0%	0/0%	0.0%	0.0%
China 3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Med	13.3%	33.0%	12.0%	5.3%	42.2%	32.2%
Alaskan	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
NC	0.0%	0.0%	18.0%	10.5%	15.8%	21.4%
B 9 5 - 8	10.0%	33.0%	42.0%	78.9%	26.2%	25.0%
Другие	9.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

Повторяющиеся элементы а.к. в С-терминальном домене образцов LMP1, полученных от коренного населения (нанайцев) и иммигрантов Хабаровского края

	253 ак			306 ак		
Code	▼					▼
B95.8	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL
	Нанайцы (Хабаровский край)					
FEEn6	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL *
FEEn9	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL *
FEEn10	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL *
FEEn12	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL *
FEEn16	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL *
FEEn1n	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL *	
FEEn4	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL *	
FEEn14	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL *	
FEEn2	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL	
FEEn11	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL	
FEEn7	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL	
FEEn18	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL	
FEEn5	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL
FEEn13	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL
FEEn8	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQGPDNTDDNG	PQGPDNTDDNG	PHDPL
FEEn3	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQGPDNTDDNG	PHDPL
FEEn15	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQGPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL	
FEEn19	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQGPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL	
FEEn17	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQGPDNTDDNG	PHDPL	
	Мигранты Дальнего Востока (Комсомольск на Амуре)					
FE1	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL *
FE2	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL *
FE4	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL *
FE6	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL *
FE16	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL *
FE17	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL *
FE23	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL *
FE7	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL *	
FE19	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL *	
FE24	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL *	
FE3	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQGPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL *	
FE8	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQGPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL *	
FE18	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQGPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL *	
FE26	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL	
FE10	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQGPDNTDDNG	PHDPL	
FE11	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQGPDNTDDNG	PHDPL	
FE22	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQGPDNTDDNG	PHDPL	
FE27	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQGPDNTDDNG	PHDPL	
FE14	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQGPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL	
FE21	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQGPDNTDDNG	PHDPL	
FE25	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQGPDNTDDNG	PHDPL	
FE5	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL	
FE9	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL	
FE15	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL	
FE28	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL
FE12	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL
FE20	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL
FE13	PQDPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PQGPDNTDDNG	PQGPDNTDDNG	PQDPDNTDDNG	PHDPL

Примечание. Повторяющиеся элементы 11 а.к. (PQDPDNTDDNG) и 5 а.к.: (PHDPL) между а.к. 253 и 306 в С-терминальном домене LMP1 прототипного штамма B95.8 показаны на первой линии. В левой колонке представлены кодовые обозначения изучаемых вариантов LMP1. PQDPDNTDDNG — повторяющийся элемент, состоящий из 11 а.к.; PQGPDNTDDNG — повторяющийся элемент, состоящий из 11 а.к. с точечной мутацией D на G; PHDPL — последовательность, состоящая из пяти аминокислот; *Последовательности LMP1, идентичные варианту LMP1 прототипного штамма ВЭБ B95-8.

анализируемых образцов *LMP1* ВЭБ у населения Дальнего Востока России. Вероятно, выявление данной мутации обусловлено географической близостью эндемичного для ВЭБ региона — КНР, а также активной взаимной миграцией населения пограничных районов РФ и КНР.

В образце *LMP1* FEn10.3, амплифицированном из смыва ротоглотки коренного населения Хабаровского края, нами обнаружена важная замена аспарагиновой кислоты на глутаминовую в 210-м положении (D210E). Известно, что данная аминокислота необходима для связывания НОС белков, что может опосредованно привести к активации транскрипционного фактора NF-κB. Кроме того, в большинстве анализируемых последовательностей *LMP1* у обеих групп выявлена замена гистидина на пролин в 358-й позиции (H358P). Указанная замена может приводить к нарушению способности этого белка связывать НОС белки. Таким образом, анализ аминокислотных последовательностей образцов *LMP1* ВЭБ, полученных от коренных жителей Дальнего Востока России и иммигрантов данного региона, позволил выявить в этих образцах ряд специфических мутаций, которые, при воздействии вредных факторов окружающей среды, могут оказаться критическими для инициации канцерогенеза ВЭБ-ассоциированных новообразований.

Повторяющиеся элементы в онкобелке *LMP1* ВЭБ

Предыдущими исследованиями показано, что С-концевой домен *LMP1* различных изолятов ВЭБ содержит варьирующее число повторов 11 аа (PQDPDNTDDNG), расположенных между а.к. 253 и 306 [24—26]. Вариант *LMP1* прототипного штамма ВЭБ В95.8 содержит четыре таких повтора и две вставки последовательностей 5 а.к. (PHDPL: 275—279): одна расположена между 11 а.к. повторами 2 и 3, а другая после последнего повтора (а.к.: 302—306). Вставка 5 а.к. представляет собой так называемый JAK3-сайт домена STAR3 *LMP1* (а.к.: 275—330), который предположительно связан с активацией JAK3/STAT сигнального пути [24, 25]. Для выяснения структурных особенностей образцов *LMP1*, полученных от аборигенов (нанайцев) и иммигрантов Хабаровского края, С-концевые домены онкобелка сравнивали по сочетаниям а.к. повторов и вставок (табл. 3). Результаты свидетельствуют о том, что процентное содержание В95.8-подобных последовательностей со вставками 5 а.к. в положении 275—300 среди образцов *LMP1*, происходящих от нанайцев и иммигрантов, существенно не отличается [26.3% (5/19) и 25.0% (7/28) соответственно, $p > 0,05$]. Различия в содержании 4 и 5-ти 11-а.к. повторов (PQDPDNTDDNG) в образцах *LMP1* независи-

мо от их происхождения были также статистически недостоверны [47.4% (9/19) у нанайцев по сравнению с 60.7% (17/28) у иммигрантов и 21.1% (4/19) у нанайцев по сравнению с 14.3% (4/28) у иммигрантов, соответственно]. Тем не менее, в отличие от образцов онкобелка от нанайцев, в *LMP1* образцах иммигрантов точечная мутация D на G встречается чаще и это различие статистически достоверно [10.5% (2/19) и 42.9% (12/28) соответственно, $p < 0,05$].

Анализируя полученные данные, можно предположить, что образование 11 а.к. повторов и 5 а.к. вставок может происходить в результате рекомбинационных событий, происходящих во время репликации вируса. Нельзя также исключить, что расположение указанных повторов и вставок является географической особенностью структуры *LMP1* у локально персистирующих штаммов ВЭБ, и, вероятно, их наличие не играет решающей роли в биологических функциях онкобелка [27, 28].

Заключение

До сих пор роль ВЭБ в возникновении патологий, ассоциированных с этим вирусом, в эндемичных регионах остается малоизученной. В данной работе впервые показано разнообразие вариантов ВЭБ, персистирующих у коренного (нанайцы) населения и иммигрантов Хабаровского края. Выявленные генетические особенности последовательностей в вариантах *LMP1* ВЭБ у нанайцев, при сравнении с таковыми у жителей европейской части РФ, позволяют предположить наличие у онкогена *LMP1* штаммов вируса, персистирующих среди аборигенов, уникальных свойств. В частности, обнаруженные аминокислотные замены в 212, 328 и 366 положениях молекулы *LMP1*, характерные для его высокотуморогенных вариантов, могут придавать этому онкобелку агрессивные характеристики. Дальнейшие исследования свойств вариантов *LMP1*, уникальных для жителей Дальнего Востока РФ, вероятно, позволят нам приблизиться к пониманию механизмов канцерогенеза для эндемичных регионов.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научно-исследовательских проектов № 14-04-01810а и № 15-34-70031мол_а_мос.

ЛИТЕРАТУРА

1. Young L.S., Rickinson A.B. Epstein—Barr virus: 40 years on. *Nat. Rev. Cancer*. 2004; 4(10): 757—68.
2. Kaye K., Izumi K., 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.
3. Mainou B.A., Raab-Traub N. LMP1 strain variants: biological and molecular properties. *J. Virol*. 2006; (80): 6458—68.
4. Fielding C.A., Sandvej K., Mehl A. et al. Epstein—Barr virus LMP-1 natural sequence variants differ in their potential to activate

- cellular signaling pathways. *J. Virol.* 2001; 75(19): 9129—41.
5. Johnson R.J., Stack M., Hazlewood S.A. et al. The 30-base-pair deletion in chinese variants of the Epstein-Barr virus LMP1 gene is not the major effector of functional differences between variant LMP1 genes in human lymphocytes. *J. Virol.* 1998; 72(5): 4038—48.
 6. Blake S.M., Eliopoulos A.G., Dawson C.W., Young L.S. The transmembrane domains of the EBV-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) variant Cao regulate enhanced signalling activity. *Virology.* 2001; (282): 278—87.
 7. Baichwal V.R., Sudgen B. Transformation of Balb3T3 by the BNLF-1 gene of Epstein—Barr virus. *Oncogene.* 1988; 2(5): 461—7.
 8. Knecht H., Bachmann E., Brousset P. et al. Deletions within the LMP1 oncogene of Epstein—Barr virus are clustered in Hodgkin's disease and identical to those observed in nasopharyngeal carcinoma. *Blood.* 1993; 82(10): 2937—42.
 9. Cheung S.-T., Lo K.-W., Leung S. et al. Prevalence of LMP1 deletion variant of Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma and gastric tumors in Hong Kong. *Int. J. Cancer.* 1996; (66): 711—20.
 10. Dolcetti R., Zancai P., de Re V. et al. Epstein—Barr virus strains with latent membrane protein-1 deletions: prevalence in the Italian population and high association with human immunodeficiency virus-related Hodgkin's disease. *Blood.* 1997; (89): 1723—31.
 11. 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.
 12. Senuyuta N., Yakovleva L., Goncharova E. et al. Epstein—Barr virus latent membrane protein 1 (LMP-1) polymorphism in nasopharyngeal carcinoma and other oral cavity tumors in Russia. *J. Medical Virology.* 2014; 86(2): 290—300.
 13. Гончарова Е.В., Сенюта Н.Б., Смирнова К.В. и др. Вирус Эпштейна—Барр (ВЭБ) в России: инфицированность населения и генотипический анализ вариантов гена LMP1 у больных ВЭБ-ассоциированными патологиями и здоровых лиц. *Вопросы вирусологии.* 2015; 60(2): 11—7.
 14. Edwards R., Seillier Moisewitsch F., Raab-Traub N. Signature amino acids changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein—Barr virus strains. *Virology.* 1999; (261): 79—95.
 15. Mainou B.A., Raab-Traub N. LMP1 strain variants: biological and molecular properties. *J. Virol.* 2006; 80(13): 6458—68.
 16. Sandvej K., Gratama J.W., Munch M. et al. Sequence analysis of the Epstein—Barr virus (EBV) latent membrane protein-1 gene and promoter region: identification of 4 variants among wild-type EBV isolates. *Blood.* 1997; (90): 323—30.
 17. Walling D., Shebib N., Weaver S. et al. The molecular epidemiology and evolution of Epstein-Barr virus: sequence variation and genetic recombination in the latent membrane protein-1 gene. *J. Infect. Dis.* 1997; (179): 763—74.
 18. Sung N.S., Edwards R.H., Seillier-Moisewitsch F. et al. Epstein-Barr virus strain variation in nasopharyngeal carcinoma from the endemic and non-endemic regions of China. *Int. J. Cancer.* 1998; 76(2): 207—15.
 19. Burt R.D., Vaughan T.L., Mcknight B. et al. Associations between human leukocyte antigen type and nasopharyngeal carcinoma in Caucasians in the United States. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1996; 5(11): 879—87.
 20. Hildesheim A., Apple R.J., Chen C.J. et al. Association of HLA class I and II alleles and extended haplotypes with nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *J. Natl. Cancer Inst.* 2002; 94(23): 1780—9.
 21. Ward M.H., Pan W.H., Cheng Y.J. et al. Dietary exposure to nitrite and nitrosamines and risk of nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *Int. J. Cancer.* 2000; 86(5): 603—9.
 22. Vaughan T.L., Stewart P.A., Teschke K. et al. Occupational exposure to formaldehyde and wood dust and nasopharyngeal carcinoma. *Occup. Environ. Med.* 2000; 57(6): 376—84.
 23. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2012 году. М.; Издательская группа ПОНЦ; 2014.
 24. Miller W.E., Edwards R.H., Walling D.M., Raab-Traub N. Sequence variation in the Epstein—Barr virus latent membrane protein. *J. Gen. Virol.* 1994; (75): 2729—40.
 25. Li S.N., Chang Y.S., Liu S.T. Effect of a 10 Amino acid deletion on the oncogenic activity of latent membrane protein 1 of Epstein—Barr virus. *Oncogene.* 1996; (12): 2129—35.
 26. Nagamine M., Takahara M., Kishibe K. et al. Sequence variations of Epstein-Barr virus LMP1 gene in nasal NK/T cell lymphoma. *Virus Genes.* 2007; (34): 47—54.
 27. Walling D.M., Raab-Traub N. Epstein—Barr virus intrastrain recombination in oral hairy leukoplakia. *J. Virol.* 1994; 68(12): 7909—17.
 28. Burrows J.M., Burrows S.R., Poulsen L.M. et al. Unusually high frequency of Epstein—Barr virus genetic variants in Papua New Guinea that can escape cytotoxic T-cell recognition: implications for virus evolution. *J. Virol.* 1996; 70(4): 2490—6.

REFERENCES

1. Young L.S., Rickinson A.B. Epstein—Barr virus: 40 years on. *Nat. Rev. Cancer.* 2004; 4(10): 757—68.
2. Kaye K., Izumi K., 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.
3. Mainou B.A., Raab-Traub N. LMP1 strain variants: biological and molecular properties. *J. Virol.* 2006; (80): 6458—68.
4. Fielding C.A., Sandvej K., Mehl A. et al. Epstein—Barr virus LMP-1 natural sequence variants differ in their potential to activate cellular signaling pathways. *J. Virol.* 2001; 75(19): 9129—41.
5. Johnson R.J., Stack M., Hazlewood S.A. et al. The 30-base-pair deletion in chinese variants of the Epstein—Barr virus LMP1 gene is not the major effector of functional differences between variant LMP1 genes in human lymphocytes. *J. Virol.* 1998; 72(5): 4038—48.
6. Blake S.M., Eliopoulos A.G., Dawson C.W., Young L.S. The transmembrane domains of the EBV-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) variant Cao regulate enhanced signalling activity. *Virology.* 2001; 282: 278—87.
7. Baichwal V.R., Sudgen B. Transformation of Balb3T3 by the BNLF-1 gene of Epstein—Barr virus. *Oncogene.* 1988; 2(5): 461—7.
8. Knecht H., Bachmann E., Brousset P. et al. Deletions within the LMP1 oncogene of Epstein—Barr virus are clustered in Hodgkin's disease and identical to those observed in nasopharyngeal carcinoma. *Blood.* 1993; 82(10): 2937—42.
9. Cheung S.-T., Lo K.-W., Leung S. et al. Prevalence of LMP1 deletion variant of Epstein—Barr virus in nasopharyngeal carcinoma and gastric tumors in Hong Kong. *Int. J. Cancer.* 1996; 66: 711—20.
10. Dolcetti R., Zancai P., de Re V. et al. Epstein—Barr virus strains with latent membrane protein-1 deletions: prevalence in the Italian population and high association with human immunodeficiency virus-related Hodgkin's disease. *Blood.* 1997; 89: 1723—31.
11. Smirnova K.V., Diduk S.V., Gurtsevich V.E. Functional analysis

- of Epstein-Barr virus latent membrane proteins (LMP1) in patients with lymphoproliferative disorders. *Biomed. Khim.* 2011; 57(1): 114—26. (in Russian)
12. Senuyuta N., Yakovleva L., Goncharova E. et al. Epstein—Barr virus latent membrane protein 1 (LMP-1) polymorphism in nasopharyngeal carcinoma and other oral cavity tumors in Russia. *J. Medical Virology.* 2014; 86(2): 290—300.
 13. Goncharova E.V., Senuyuta N.B., Smirnova K.V. et al. Epstein—Barr virus in Russia: infection of the population and analysis of the LMP1 gene variants in patients with EBV-associated pathologies and healthy individuals. *Vopr. Virology.* 2015; 60(2); 11—7. (in Russian)
 14. Edwards R., Seillier Moiseiwitsch F., Raab-Traub N. Signature amino acids changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein—Barr virus strains. *Virology.* 1999; (261): 79—95.
 15. Mainou B.A., Raab-Traub N. LMP1 strain variants: biological and molecular properties. *J. Virol.* 2006; 80(13): 6458—68.
 16. Sandvej K., Gratama J.W., Munch M. et al. Sequence analysis of the Epstein—Barr virus (EBV) latent membrane protein-1 gene and promoter region: identification of 4 variants among wild-type EBV isolates. *Blood.* 1997; (90): 323—30.
 17. Walling D., Shebib N., Weaver S. et al. The molecular epidemiology and evolution of Epstein—Barr virus: sequence variation and genetic recombination in the latent membrane protein-1 gene. *J. Infect. Dis.* 1997; (179): 763—74.
 18. Sung N.S., Edwards R.H., Seillier-Moiseiwitsch F. et al. Epstein—Barr virus strain variation in nasopharyngeal carcinoma from the endemic and non-endemic regions of China. *Int. J. Cancer.* 1998; 76(2): 207—15.
 19. Burt R.D., Vaughan T.L., Mcknight B. et al. Associations between human leukocyte antigen type and nasopharyngeal carcinoma in Caucasians in the United States. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1996; 5(11): 879—87.
 20. Hildesheim A., Apple R.J., Chen C.J. et al. Association of HLA class I and II alleles and extended haplotypes with nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *J. Natl. Cancer Inst.* 2002; 94(23): 1780—9.
 21. Ward M.H., Pan W.H., Cheng Y.J. et al. Dietary exposure to nitrite and nitrosamines and risk of nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *Int. J. Cancer.* 2000; 86(5): 603—9.
 22. Vaughan T.L., Stewart P.A., Teschke K. et al. Occupational exposure to formaldehyde and wood dust and nasopharyngeal carcinoma. *Occup. Environ. Med.* 2000; 57(6): 376—84.
 23. Davydov M.I., Aksel E.M. Statistics of malignancies in Russia and CIS countries in 2012. Moscow: RCRC publishing group; 2014. (in Russian)
 24. Miller W.E., Edwards R.H., Walling D.M., Raab-Traub N. Sequence variation in the Epstein—Barr virus latent membrane protein. *J. Gen. Virol.* 1994; (75): 2729—40.
 25. Li S.N., Chang Y.S., Liu S.T. Effect of a 10Amino acid deletion on the oncogenic activity of latent membrane protein 1 of Epstein—Barr virus. *Oncogene.* 1996; (12): 2129—35.
 26. Nagamine M., Takahara M., Kishibe K. et al. Sequence variations of Epstein—Barr virus LMP1 gene in nasal NK/T cell lymphoma. *Virus Genes.* 2007; (34): 47—54.
 27. Walling D.M., Raab-Traub N. Epstein—Barr virus intrastrain recombination in oral hairy leukoplakia. *J. Virol.* 1994; 68(12): 7909—17.
 28. Burrows J.M., Burrows S.R., Poulsen L.M. et al. Unusually high frequency of Epstein—Barr virus genetic variants in Papua New Guinea that can escape cytotoxic T-cell recognition: implications for virus evolution. *J. Virol.* 1996; 70(4): 2490—6.

Поступила 20.10.2017

Принята в печать 22.11.2017

Сведения об авторах:

Смирнова Ксения Валерьевна, и. о. зав. лабораторией вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; **Дидук Сергей Васильевич**, науч. сотр. лаб. вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России; **Гурцевич Владимир Эдуардович**, вед. науч. сотр. лаб. вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России.