

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

ФГБУ Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина РАМН, Москва

# Влияние точечных мутаций в белке LMP1 вируса Эпштейна–Барр на цитоскелет клетки и активацию индуцибельной формы NO-синтазы

*В состав генома вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) входит онкоген LMP1, который играет ключевую роль в развитии ВЭБ-ассоциированных патологий человека. Отличительной особенностью этого вирусного белка является его полиморфизм. Ранее в различных географических регионах планеты были выявлены характерные мутации в последовательности LMP1, но их влияние на функциональные свойства онкогена остается до сих пор невыясненным. В нашем исследовании впервые показано значение отдельных часто выявляемых точечных мутаций и их сочетаний в LMP1 в активации индуцибельной формы NO-синтазы. Кроме того, нами исследовано влияние этих мутаций, локализованных в STAR-областях молекулы LMP1, на структурные компоненты клеток крысиных фибробластов Rat 1.*

**Ключевые слова:** вирус Эпштейна–Барр, белок LMP1, iNOS, актин, паксиллин.

62

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) является этиологическим агентом инфекционного мононуклеоза и различных злокачественных новообразований человека, таких как лимфома Беркитта, лимфома Ходжкина, недифференцированный рак носоглотки (НРНГ) и ряда других злокачественных и доброкачественных патологий [1]. При латентном типе ВЭБ-инфекции синтезируется ряд белков этого вируса, включая ядерные (EBNA1, EBNA2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C и EBNA-LP) и латентные мембранные (LMP1, LMP-2A и LMP-2B) белки [2]. Наибольший интерес среди них вызывает признанный в качестве онкогена белок LMP1, способный трансформировать клетки крысиных фибробластов, приводить к иммортализации и пролиферации В-лимфоциты человека *in vitro*, а у бестимусных мышей вызывает развитие опухоли [3, 4]. Возникновение НРНГ также сопровождается экспрессией этого белка, инициирующего опухолевую трансформацию эпителиальных клеток.

LMP1 представляет собой трансмембранный белок с молекулярной массой 63 кДа. Свойства этого белка во многом определяются его высоким сходством с членами семейства рецепторов факторов некроза опухоли (TNF-R). Влияние LMP1 на клетку осуществляется через взаимодействие этого вирусного белка с различными клеточными молекулами и внутриклеточными сигнальными каскадами. В этот процесс вовлечены две трансактивирующие области LMP1, локализованные в его С-концевом цитоплазматическом домене (STAR1 и STAR2). Подобно TNF-рецептору данные области взаимодействуют с клеточными адаптерными молекулами TRAF2, -3, -5, -6, TRADD, вызывая активацию различных транскрипционных факторов [5]. Известно, что белок LMP1 индуцирует экспрессию ряда антиапоптотических белков (Bcl2, A20, TNFAIP3, MCL1) и стимулирует секрецию таких цитокинов, как IL6, IL8 и IL10 [6]. Кроме того, он вызывает активацию с-Jun N-терминальной киназы (AP1),

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

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS

## The influence of point mutations in the Epstein-Barr virus LMP1 oncogene on the cell cytoskeleton and activation of inducible form of NO synthase

*One of the latent proteins encoded by the Epstein–Barr virus (EBV), the latent membrane protein 1 (LMP1), plays a key role in developing of EBV-associated human malignancies. Polymorphism of LMP1 protein is its characteristic feature. Some specific mutations in LMP1 genome have previously been detected in different geographic regions, however, the influence of these mutations on functional activity of LMP1 was not still determined. In this study we demonstrated for the first time the significance of individual point mutations among common ones observed in LMP1 and their combination on activation of the inducible form of nitric oxide synthase (iNOS). In addition, the influence of above mutations localized in the STAR regions of the LMP1 molecule has also been investigated on structural components of the fibroblasts of the Rat 1 cell line.*

**Key words:** the Epstein–Barr virus, the latent membrane protein 1, iNOS, actin, paxillin.

фосфоинозитол-3-киназы (PI3-K), канонического и неканонического путей активации транскрипционного ядерного фактора NF- $\kappa$ B, а также приводит к индукции p42/p44 MAPK сигнального пути и p38 митоген активируемой протеинкиназы (p38 MAPK) [7–12]. Онкоген LMP1 также вызывает образование активированных кислород-содержащих метаболитов (АКМ), таких как супероксид-анион ( $O_2^{\cdot-}$ ), перекись водорода ( $H_2O_2$ ), гидроксильный радикал ( $OH^{\cdot}$ ) и оксид азота ( $NO^{\cdot}$ ). Индукция АКМ, в свою очередь, инициирует транскрипцию целого спектра генов, в том числе ответственных за регуляцию клеточного цикла, апоптоза и ангиогенеза [13, 14].

Недавно показано, что экспрессия LMP1 при нРНГ сопровождается усилением метастазирования опухоли [15]. Ключевая роль LMP1 в этом процессе также подтверждается экспериментами *in vitro*. Так, известно, что синтез белка в инфицированных клетках приводит к увеличению подвижности и инвазивному росту трансфицированных эпителиальных клеток. Помимо активации NF- $\kappa$ B и MAPK-киназных каскадов в процесс трансформации, вероятно, вовлечены и другие белковые молекулы, влияющие на клеточную подвижность и выживаемость. Одним из таких белков является индуцируемый гипоксией фактор HIF1, способный активировать порядка ста генов, продукты которых участвуют в регуляции ключевых внутриклеточных процессов. Важно отметить, что уровень активации АКМ, в частности окиси азота (NO), белком LMP1 во многом зависит от наличия определенных мутаций в различных вариантах этого онкогена.

Приоритетность изучения генетических перестроек в белке LMP1 становится очевидной, учитывая их способность модулировать активность ключевых внутриклеточных молекул, таких как индуцибельная NO-синтаза (iNOS), которая в свою очередь определяет уровень NO в клетке. В этой связи особенно пристального внимания требуют к себе такие часто встречающиеся мутации, как замена изолейцина на лейцин в 85 положении (I85L), фенилаланина на тирозин в 106 (F106Y), глицина на серин в 212 (G212S), серина на треонин в 366 (S366T), а также Ca-подобные делеции (10 аминокислот). Роль этих мутаций в усилении трансформирующей активности LMP1 и нарушении сигнальной функции транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B в настоящее время уже убедительно доказана.

В данной работе нами показано влияние вышеуказанных часто встречающихся точечных мутаций белка LMP1 и их сочетаний на ослабление активации индуцибельной формы NO-синтазы (iNOS). Кроме того, используя клеточные линии крысиных фибробластов Rat1, мы обнаружили изменения в структурных компонентах клетки, таких как паксиллин и актиновые филаменты, которые вызваны экспрессией мутантных форм онкогена LMP1.

## Методы исследования

**Плазмиды.** Векторные конструкции pSG5LMP1-B95-8 и pSG5LMP1-Cao были любезно предоставлены F. Grasser (Хомбург, Германия). Варианты гена *LMP1*, имеющие единичные (G212S, T350A, S366T), двойные (G212S/T350A, G212S/S366T) и тройные замены (G212S/T350A/S366T, Triple) в HOS-сайтах в составе вектора pSG5 получены от S. Fuchs (Пенсильвания, США). Все вышеперечисленные варианты полноразмерного *LMP1* были нами переклонированы из эукариотического экспрессирующего вектора pSG5 в ретровирусный вектор pBabe-puro (pBabe). Прототипный вариант *LMP1-B95-8*

и варианты *LMP1* с мутациями в HOS-сайтах клонировали в вектор pBabe по сайтам рестрикции EcoRI. Высокотуморогенный вариант *LMP1-Cao* клонировали по сайту рестрикции BamHI.

**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-глутамин, 100 ед/мл гентамицин при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. 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 Rat1 трансдуцировали очищенным от клеточного дегриза супернатантом в присутствии полибрена (4 мг/мл) в течение ночи. Селекцию клеток производили пуромицином (5 мг/мл, Sigma, США).

**Получение клеточных лизатов и вестерн-блот анализ.** Клетки линии Rat1, постоянно экспрессирующие различные варианты *LMP1*, трижды отмывали в PBS, суспендировали в 200 мкл лизирующего буфера (Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 10% глицерин; 0,1%  $\beta$ -меркаптоэтанол), обрабатывали ультразвуком «Ultrasonic Amplifier» (Англия) и кипятили 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 Брэдфорда, оптическую плотность экстракта измеряли спектрофотометром «Junway 6305» (Англия). Разделение белков проводили в 12,5% полиакриламидном геле с 0,1% SDS в буфере для электрофореза (25 mM Tris-HCl; 200 mM глицин; 0,1% SDS) при силе тока 20 mA. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли с помощью аппарата для полусухого переноса «Fastblot B43» (Biometra, Германия) при напряжении 2,5 mA/cm, при 4°C, 30 мин. Эффективность переноса белков определяли окрашиванием мембраны раствором S. Ponceau. Краситель удаляли промывкой в 0,01M Tris-HCl. Блокировку проводили в течение 1 ч в 5% растворе обезжиренного сухого молока, растворенного в PBS. Затем мембрану с белками инкубировали в течение 12 ч при 4°C со следующими моноклональными антителами: NOS20 (к iNOS, Santa Cruz, США),  $\kappa$   $\beta$ -катенину (Sigma, США) и S12 к *LMP1*. Последние получены от F. Grasser (Хомбург, Германия). После обработки антителами мембрану промывали в PBS и инкубировали с вторичными антителами 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>. Для измерения количества белка в окрашенных полосах их сканировали, интенсивность окраски полос определяли с помощью компьютерной программы ImageJ.

**Флуоресцентная микроскопия.** Клетки Rat1, постоянно экспрессирующие исследуемые варианты *LMP1*, сеяли на 60 мм чашки Петри в количестве  $1,2 \times 10^6$  с добавлением 5 мл ростовой среды DMEM (Sigma, США) и дальнейшей инкубацией их в течение ночи при +37°C и 5% содержания CO<sub>2</sub>. На следующий день клетки отмывали 2 раза физиологическим раствором на 0,01M фосфатном буфере (PBS), фиксировали 3,7% раствором формальдегида в течение 10 мин и экстрагировали 1% тритоном X-100

(Serva, Германия) на PBS в течение 3–5 мин. Все растворы, используемые для экстракции и фиксации, предварительно нагревали до 37°C. Фиксированные клетки инкубировали 45 мин в растворе первых антител (к паксиллину), отмывали 3 раза в PBS в течение 20 мин, затем инкубировали в растворе вторых антител в течение 45 мин. Окрашивание проводили при комнатной температуре. Для выявления паксиллина использовали мышиные моноклональные антитела (BD Transduction Laboratories, США). При второй инкубации использовали козы антитела к мышным иммуноглобулинам, конъюгированные с родамином. Для выявления актина применяли меченный родамином фаллоидин (Sigma, США). Полученные препараты исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа «Axiohot» (Zeiss).

### Результаты и их обсуждение

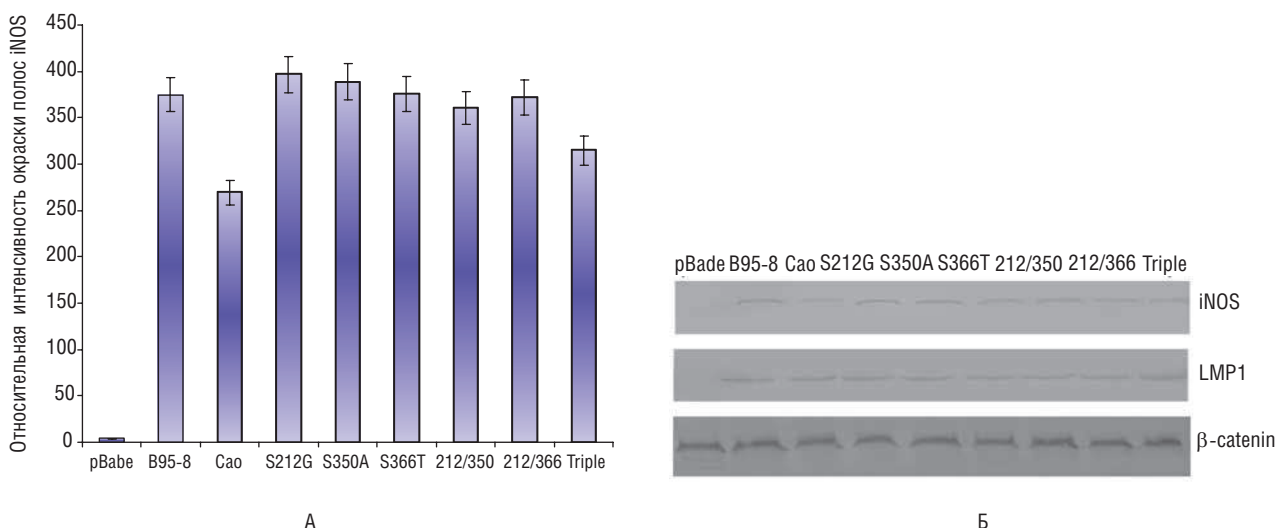
**Влияние мутаций в белке LMP1 ВЭБ на индукцию iNOS.** Настоящее исследование направлено на изучение молекулярных механизмов канцерогенеза, индуцированного вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ). Поскольку онкоген *LMP1* ВЭБ несет в своей последовательности ряд значимых точечных мутаций, приводящих к усилению трансформирующих свойств продукта этого гена, задача данного исследования состояла в выяснении способности мутаций гена *LMP1* влиять на уровень активации индуцибельной формы NO-синтазы (iNOS). С этой целью мы анализировали индукцию iNOS в клеточных линиях Rat1, трансфицированных мутантными вариантами *LMP1*, а также контрольными вариантами, прототипными низкотуморогенным *LMP1-B95-8* и высокотуморогенным *LMP1-Cao*. В результате проведенных экспериментов было показано, что накопление белков, содержащих единичные (G212S, S350A, S366T), а также двойные (G212S/S350A и G212S/S366T) мутации, не оказывают существенного влияния на индукцию iNOS, а вызванные их экспрессией уровни активации этого фермента схожи с таковыми для низкотуморогенного варианта *LMP1-B95-8*. Более наглядно это можно видеть

на графике, где с помощью компьютерной программы Image J определена оптическая плотность каждой полосы (рис. 1А). Значительное же понижение уровня индукции iNOS нами обнаружено при экспрессии высокотрансформирующего варианта *LMP1-Cao* и варианта, несущего три аминокислотные замены (G212S/S350A/S366T), локализованные в трансактивирующих (STAR) областях белка *LMP1* (рис. 1Б). Полученные данные свидетельствуют о необходимости присутствия, по крайней мере, трех мутаций в *LMP1* для значительного снижения индукции iNOS и, как следствие, снижения образования окиси азота (NO).

Анализ последовательностей *LMP1*, кодируемых вариантами онкогена *LMP1* ВЭБ, в различных географических регионах мира показал, однако, что образцы белка с единичными аминокислотными заменами не выявляются вообще. Минимальный набор мутаций, обнаруженный в белке *LMP1*, состоящий из четырех аминокислотных замен (F106Y, D210E, E328Q и S366T), обнаружен в низкодивергентных вариантах *LMP1*, доминирующих, в частности, у больных ВЭБ-ассоциированными злокачественными и доброкачественными лимфопролиферативными патологиями в России [12]. По-видимому, определенные количества и сочетания мутационных перестроек в онкогене *LMP1* играют важную роль в усилении его трансформирующего потенциала. Данное предположение во многом находит подтверждение в полученных нами данных, указывающих на отсутствие влияния одиночных и двойных мутаций в *LMP1* на индукцию iNOS, накопление NO и, наоборот, ослабление их активации при наличии трех и более мутаций (как в случае с *LMP1-Cao*) в STAR-областях исследуемой молекулы белка.

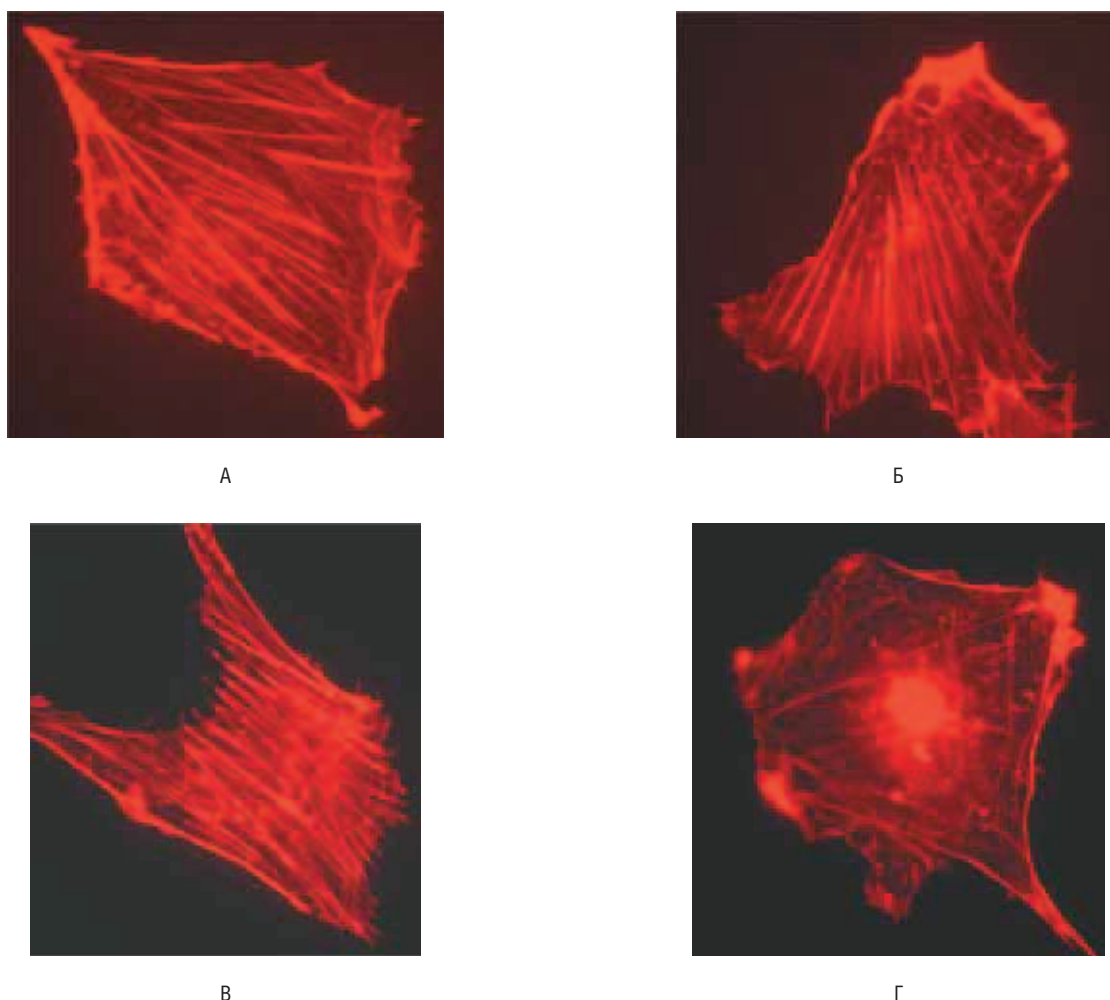
**Изменение цитоскелета клеток при экспрессии мутантных вариантов LMP1 ВЭБ.** Белок *LMP1* вируса Эпштейна–Барр оказывает плеiotропное действие на различные внутриклеточные процессы, что может приводить к изменению структурных компонентов цитоскелета. Как показано ранее, в данном процессе принимает участие C-терминальный цитоплазматический домен (STAR) молекулы *LMP1* [12]. Кроме того, известно, что активные формы кислорода и азота индуцируют митоген-

64



**Рис. 1.** Индукция iNOS при экспрессии вариантов *LMP1*:

А – денситометрический анализ активации iNOS клеточными линиями Rat1, экспрессирующими исследуемые варианты *LMP1*; Б – вестерн-блот анализ с использованием антител, специфичных к iNOS (NOS20), *LMP1* (S12) и β-катенину. β-катенин использовался в качестве контроля нанесения



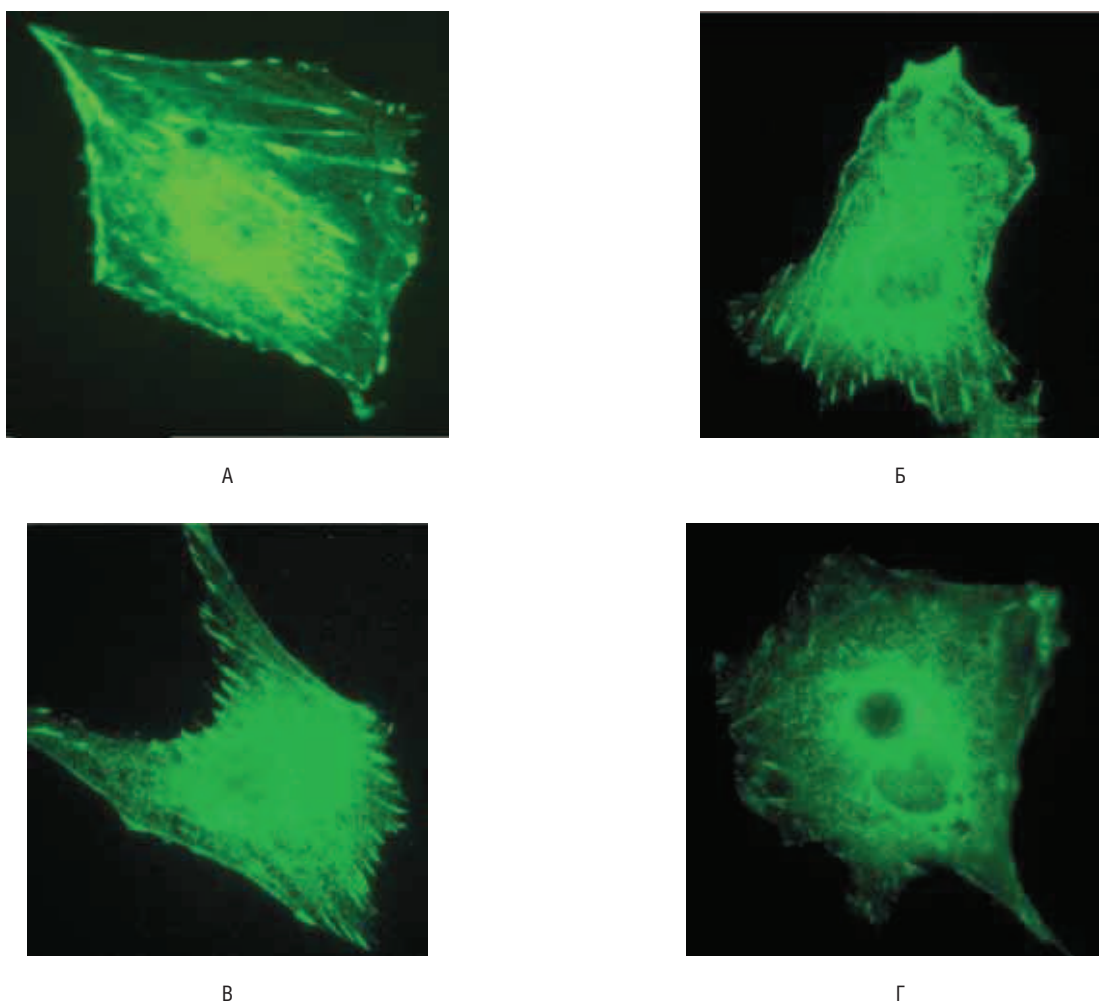
**Рис. 2.** Фибробласты Rat1, экспрессирующие различные варианты LMP1. А – pBabe-puro; Б – LMP1-B95-8; В – LMP1-Triple; Г – LMP1-Cao. Стресс-фибриллы (актиновый цитоскелет) ориентированы вдоль длинной оси клетки. Иммунофлуоресцентная микроскопия. Масштаб – 10 мкм

активируемые протеинкиназы (МАРК) и принимают участие в регуляции транскрипции генов металлопротеиназ, ряда цитокинов и адгезинов. Учитывая вышесказанное, представлялось важным выяснить влияние трех исследуемых нами мутаций в STAR-доменах LMP1, приводящих, как показано, к снижению уровня индукции iNOS и понижению накопления NO, на изменения структурных компонентов цитоскелета.

Используя методику прижизненной окраски актиновых структур клетки, мы наблюдали образование многочисленных стресс-фибрилл в клетках Rat1 при накоплении в них как прототипного варианта LMP1-B95-8, так и мутантного варианта LMP1-Triple (рис. 2Б, 2В). В случае синтеза варианта LMP1-Cao мы обнаружили в клетках Rat1 лишь отдельные тонкие пучки актиновых филаментов в цитоплазме клеток (рис. 2Г). С помощью метода иммунофлуоресцентной микроскопии и соответствующих специфических антител нам удалось выявить образование длинных штриховых контактов паксиллина, расположенных ближе к основанию ламеллы в клетках, трансфицированных LMP1-B95-8 и LMP1-Triple (рис. 3Б, 3В). В клетках, трансфицированных LMP1-Cao, обнаружено лишь формирование точечных контактов паксиллина (рис. 2Г, 3Г). Во всех клетках, синтезирующих варианты LMP1, актиновые пучки, а также паксиллины были ориентированы вдоль длинной оси клетки (рис. 2, 3).

Изучение влияния онкогенов на цитоскелет клетки является ключевой проблемой для понимания механизма метастазирования опухоли. В то же время роль LMP1 в данном процессе в настоящее время изучена недостаточно. В настоящей работе нами поднят вопрос о влиянии часто встречающихся мутаций в белке LMP1 на внутриклеточные актиновые структуры и паксиллиновые контакты. Анализируя полученные данные, можно утверждать, что изучаемые нами часто встречающиеся мутации в карбоксильном домене молекулы LMP1 не влияют на изменения актиновых филаментов и паксиллина в клетках, трансфицированных такими вариантами вирусного белка.

Учитывая современные данные о полиморфизме гена LMP1 ВЭБ, можно предположить, что дивергенция этого гена сводится к формированию высокомутантных изоформ, подобных LMP1-Cao и другим. При этом основными отличиями последних от прототипного варианта LMP1-B95-8 являются отсутствие цитотоксического/антипролиферативного эффекта, повышение трансформирующей способности, что подтверждается опытами *in vitro*, а также резкое снижение иммуногенных свойств *in vivo*. Основываясь на этих данных, можно предположить, что последующие изучения мутаций этого вирусного онкогена позволят обнаружить в нем такой набор и сочетание критических изменений, которые приводят к резкому усилению трансформирующей способности LMP1 [16].



**Рис. 3.** Фибробласты Rat1, экспрессирующие различные варианты LMP1. А – pVabe-puro; Б – LMP1-B95-8; В – LMP1-Triple; Г – LMP1-Sao. Фокальные контакты (окрашивание на паксиллин), ориентация вдоль длинной оси клетки. Иммунофлуоресцентная микроскопия. Масштаб – 10 мкм

Таким образом, проведенное нами исследование позволило впервые показать влияние отдельных точечных мутаций в гене *LMP1* ВЭБ на его способность регулировать активацию индуцибельной формы NO-синтазы, одной из важнейших внутриклеточных молекул, участвующей в образовании окиси азота. Являясь активной формой азота, NO наряду с цитокинами влияет на клеточные эффекторные системы, контролирующие пролиферацию, апоптоз и дифференцировку клетки, а также ее устойчивость к стрессовым воздействиям. Кроме того,

мы показали недостаточность трех аминокислотных замен для проявления способности белка LMP1 вызывать изменения структурных компонентов цитоскелета подобно тому, как неспособна это сделать высокотрансформирующая форма LMP1-Sao. Дальнейшие исследования в данном направлении, а также анализ функциональной активности более дивергентных вариантов белка LMP1 ВЭБ, вероятно, позволят выявить молекулярный механизм, приводящий к трансформации клетки этим вирусом.

#### REFERENCES

1. Young L.S., Rickinson A.B. Epstein–Barr virus: 40 years on. *Nat. Rev. Cancer.* 2004; 4 (10): 757–768.
2. Young L., Alfieri C., Hennessy K. et al. Expression of Epstein–Barr virus transformation-associated genes in tissues of patients with EBV lymphoproliferative diseases. *New Engl. J. Med.* 1989; 321: 1080–1085.
3. 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: 9150–9154.
4. 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: 1638–1646.
5. Mosialos G., Birkenbach M., Yalamanchili R. et al. The Epstein–Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell.* 1995; 80: 389–399.
6. Mosialos G. Cytokine signaling and Epstein–Barr virus-mediated cell transformation. *Cytokine & Growth Factor.* 2001; 12: 259–270.
7. McFarland M.D.C., Izumi K.M., Mosialos G. Epstein–Barr virus transformation: involvement of latent membrane protein 1-mediated activation of NF- $\kappa$ B. *Oncogene.* 1999; 18: 6959–6964.

8. Wu L., Nakano H., Wu Z. The C-terminal activating region 2 of the Epstein–Barr virus-encoded latent membrane protein 1 activates NF- $\kappa$ B through TRAF6 and TAK1. *J. Biol. Chem.* 2006; 281 (4): 2162–2169.
9. Eliopoulos A.G., Young L.S. Activation of the cJun N-terminal kinase (JNK) pathway by the Epstein–Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1). *Oncogene.* 1998; 16: 1731–1742.
10. Eliopoulos, A.G., Blake, S.M., Floettmann, J.E. et al. Epstein–Barr virus-encoded latent membrane protein 1 activates the JNK pathway through its extreme C terminus via a mechanism involving TRADD and TRAF2. *J. Virol.* 1999; 73: 1023–1025.
11. Lam N., Sugden B. CD40 and its viral mimic, LMP1: similar means to different ends. *Cell. Signal.* 2003; 15: 9–16.
12. Dawson C.W., Tramontanis G., Eliopoulos A.G., Young L.S. Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to promote cell survival and induce actin filament remodeling. *J. Biolog. Chem.* 2003; 278 (6): 3694–3704.
13. Wakisaka N., Kondo S., Yoshizaki T. et al. Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 induces hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Molecular and Cellular Biol.* 2004; 24 (12): 5223–5234.
14. Yu J., Tsai H., Wu C. et al. Induction of inducible nitric oxide synthase by Epstein–Barr virus B95-8-derived LMP1 in BALB/3T3 cells promotes stress-induced cell death and impairs LMP1-mediated transformation. *Oncogene.* 2002; 21: 8047–8061.
15. Chew M.M., Gan S.Y., Khoo A.S., Tan E.L. Interleukins, laminin and Epstein–Barr virus latent protein 1 (EBV LMP1) promote metastatic phenotype in nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer.* 2010; 10: 574.
16. Smirnova K.V., Diduk S.V., Gurtsevich V.E. Funkcional'nyi analiz variantov latentnogo membrannogo belka 1 (LMP1) virusa Epshteina–Barr u bol'nyh limfoproliferativnymi zabolevaniyami. *Biomeditsinskaya himiya.* 2010; 3: 273–284.

#### КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Дидук Сергей Васильевич**, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза Российского онкологического научного центра имени Н.Н. Блохина РАМН

**Адрес:** 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24

**Тел.:** (495) 323-57-55, **факс:** (495) 324-12-05

**E-mail:** diduksv@rambler.ru

**Смирнова Ксения Валерьевна**, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза Российского онкологического научного центра имени Н.Н. Блохина РАМН

**Адрес:** 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24

**E-mail:** smirnovakv@rambler.ru

**Гурцевич Владимир Эдуардович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза Российского онкологического научного центра имени Н.Н. Блохина РАМН

**Адрес:** 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24

**Тел.:** (495) 324-25-64

**E-mail:** gurtsevitch@yahoo.com