

Л. Ковалевська<sup>1</sup>,  
А. Матвєєва<sup>1</sup>,  
І. Титоренко<sup>2</sup>,  
І. Крячок<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького НАН України,

<sup>2</sup> Державне некомерційне підприємство “Національний інститут раку”, Київ, Україна

**Ключові слова:** хронічний лімфолейкоз, фактори транс-крипції, апоптоз, ядерні антигени EBNA, EBNA-2, мембранні білки LMP, LMP-1, злоякісна трансформація, проліферація

DOI: <https://doi.org/10.15407/oncology.2024.04.249>

## ОСОБЛИВОСТІ ПРОГРАМИ ЛАТЕНТНОЇ ІНФЕКЦІЇ ВІРУСОМ ЕПШТЕЙНА-БАРР В-КЛІТИН ПРИ ХРОНІЧНОМУ ЛІМФОЛЕЙКОЗІ

Лікування гематологічних захворювань є однією з найскладніших проблем сучасної медицини. Відомо, що в основі гуморального імунітету лежать В-лімфоцити, які на термінальних стадіях диференціювання перетворюються в антитілоутворюючі імунобласти та плазматичні клітини. Хронічний лімфолейкоз (ХЛЛ) розвивається зі значним збільшенням фенотипово зрілих, але імунонекомпетентних В-лімфоцитів, які характеризуються наявністю атипової експресії маркерів. Питання щодо причин інгібування клітинного сигнального шляху, відповідального за проліферацію та апоптоз у зрілих В-лімфоцитах пацієнтів з ХЛЛ, є надзвичайно важливими, але все ще недостатньо вивченими. Поглиблений аналіз ключових гравців сигнальних каскадів і факторів транскрипції, які функціонально пригнічуються при ХЛЛ, покращить прогноз перебігу захворювання та допоможе розробити персоналізоване лікування для таких пацієнтів.

Вивчення молекулярних механізмів, що лежать в основі канцерогенезу, є важливою сферою онкології. Глибше розуміння складних і багаторівневих процесів канцерогенезу може призвести до розробки більш точних методів ранньої діагностики та лікування злоякісних новоутворень.

Лейкемії становлять близько 2,2% усіх ново виявлених випадків раку, рівень захворюваності дещо вищий у чоловіків (2,73%) порівняно з жінками (1,79%) [1]. В Європі та Україні найпоширенішим видом гемобластозів є хронічний лімфолейкоз (ХЛЛ), на який припадає близько 30% усіх онкогематологічних випадків. Рівень захворюваності становить приблизно 4,2 на 100 000 осіб [1–3]. Захворювання в основному діагностується у людей похилого віку, причому чоловіки хворіють в 1,5–2,0 раза частіше, ніж жінки. Середній вік на момент встановлення діагнозу становить близько 70 років для чоловіків і 74 роки для жінок. Слід зазначити, що пацієнти молодше 65 років вважаються “молодими” в контексті ХЛЛ, що вказує на те, що ХЛЛ є злоякісним новоутворенням, яке переважно проявляється у старшому віці.

### ХАРАКТЕРИСТИКА І ПЕРВИННА ДІАГНОСТИКА ХЛЛ

ХЛЛ характеризується накопиченням лейкозних В-лімфоцитів, які експресують поверхневі маркери Т-клітин (CD5) і В-клітин (CD19 і CD23) [4]. Для діагностики ХЛЛ необхідна кількість циркулюючих В-лімфоцитів, що перевищує (5–10)·10<sup>6</sup> на мл, а також клональна проліферація В-клітин у кістковому мозку [5]. Основною гіпотезою походження ХЛЛ є накопичення імунологічно не-

компетентних В-лімфоцитів, які демонструють мінімальну проліферацію [6].

Згідно з класифікацією Всесвітньої організації охорони здоров'я, ХЛЛ та мала лімфоцитарна лімфома (МЛЛ), попередник ХЛЛ, що переважно вражає лімфатичні вузли та демонструє подібний морфологічний фенотип, відносяться до злоякісних новоутворень зрілих В-клітин [7].

Можна виділити два підтипи ХЛЛ, незважаючи на їх схожі морфологічні та імунологічні фенотипи. Клінічні прояви ХЛЛ відрізняються між цими підтипами та визначаються мутаційним статусом варіабельної ділянки гена важкого ланцюга імуноглобуліну (Ig). Такими підтипами є ХЛЛ з мутованою формою варіабельної області гена важкого ланцюга Ig (IGHV-M) і ХЛЛ з немутованою формою (IGHV-UM). Підтип IGHV-M зазвичай пов'язаний зі сприятливим прогнозом, тоді як підтип IGHV-UM пов'язаний із гіршим прогнозом [8, 9]. Ця різниця, ймовірно, пов'язана з різними генетичними змінами, рівнем клональності, епігенетичними змінами, активацією або інгібуванням клітинних сигнальних шляхів і взаємодією з мікрооточенням у лімфатичних вузлах або кістковому мозку.

Невелика частка хворих на ХЛЛ має сімейний анамнез захворювання, і в таких випадках ризик розвитку ХЛЛ серед найближчих родичів у кілька разів перевищує середньопопуляційний ризик [10].

Мікрооточення має важливе значення для підтримки життєздатності клітин ХЛЛ. Допоміжні клітини (nurse cells) кісткового мозку, мезенхімальні стромальні клітини, Т-клітини та природні

кілери (Natural killer, NK), клітини виконують цю роль, взаємодіючи з клітинами ХЛЛ через різні молекули адгезії, хемокові рецептори, білки родини TNF та інші розчинні фактори [11].

### ЗМІНИ ФУНКЦІОНУВАННЯ КЛІТИННИХ СИГНАЛЬНИХ ШЛЯХІВ У В-КЛІТИНАХ ПРИ ХЛЛ

Зазвичай В-клітинні рецептори (BCR) та їхні сигнальні каскади активуються (ауто-)антигенами або автономними механізмами [12]. Слід зазначити, що сигнальні шляхи, які контролюються протеїнами NOTCH1, TP53 і TNFR2-TRAF не функціонують у клітинах ХЛЛ [13]. Це підкреслює необхідність виявлення змінених клітинних сигнальних шляхів у В-лімфоцитах, уражених ХЛЛ, для підтримки розробки нових підходів до лікування.

Так, нещодавно нами було виявлено, що низка генів, які індуються в результаті активації клітинного сигнального шляху TGFB-SMAD2/3 на базальному рівні, а саме *BCL2L1* (*BCL-XL*), *CCND2* (*Cyclin D2*), *ID1* і *MYC*, також є залежними від активації клітинного сигнального шляху IL2- JAK-STAT2/5. Було показано, що рівень експресії мРНК генів, які можуть бути трансактивовані завдяки активації цих двох сигнальних шляхів, значно знижений у клітинах ХЛЛ порівняно з В-клітинами периферичної крові здорових донорів, і що клітинні сигнальні шляхи TGFB-SMAD2/3 та IL-2-STAT2/5 (JAK-STAT5) не функціонують на базальному рівні в В-лімфоцитах пацієнтів із ХЛЛ [14].

Нами було показано, що одним із факторів, що обумовлюють неактивність сигнального шляху TGFB-SMAD у лейкозних клітинах є низька експресія (нижче можливого рівня її виявлення за допомогою імуофлуоресцентного аналізу) білка

SMAD2, а також відсутність SMAD3 і SMAD4 та білкових гетеродимерів з ядерною локалізацією.

Причина інгібування сигнального шляху IL-2-STAT (JAK-STAT5) на базальному рівні в клітинах ХЛЛ ще не виявлена, але це може бути низький рівень фосфорилування або повна відсутність фосфорилування білків STAT5 (STAT5A і STAT5B) в лейкозних клітинах. Білок STAT5A має цитоплазматичну локалізацію, тобто в В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ відсутні ядерні білкові комплекси, які зазвичай активують трансактивацію генів, залежних від фактора транскрипції STAT5. Таким чином, В-клітини при ХЛЛ не мають можливості ні диференціюватися, ні проліферувати, ні увійти в апоптоз, хоча вони продовжують секретувати певні цитокіни (рис. 1).

Через накопичені знання виникають питання: чи можливо змусити клітини В-ХЛЛ відповідати на сигнали через, наприклад, рецептори IL-2, TGFB, TNFB або інші? Як можна примусити клітини ХЛЛ відповідати на сигнали із мікрооточення, заставивши їх проліферувати і стати мішенню для хіміотерапії або направивши їх у апоптоз?

### ВІРУС ЕПШТЕЙНА-БАРР ЯК ТРАНСФОРМУЮЧИЙ АГЕНТ ДЛЯ ЛІМФОЦИТІВ

Одним із найбільш відомих трансформуючих агентів В-клітин є вірус Епштейна-Барр (Epstein-Barr virus, EBV), який було відкрито у 1964 р. та який і досі використовують у моделі трансформації В-клітин *in vitro*. EBV є лімфотропним вірусом, що належить до сімейства *Herpesviridae* і класифікується як гамма-герпесвірус. EBV був вперше виявлений Ентоні Епштейном (Antony Epstein) та Деніз Барр (Denise Barr) з лінії клітин лімфоми Беркітта (Burkitt lymphoma, BL) і став першим людським вірусом, визначеним як потенційно онкогенний [15, 16].

Близько 90% дорослого населення світу інфіковано EBV. У регіонах, що розвиваються, первинне інфікування зазвичай відбувається протягом перших кількох років життя і, як правило, протікає безсимптомно. Однак, коли первинне зараження відбувається в підлітковому або дорослому віці, це може призвести до самообмежувального синдрому інфекційного мононуклеозу [17].

Окрім лімфоми Беркітта, EBV асоціюється з іншими лімфоїдними та епітеліальними злоякісними новоутвореннями, такими як лімфома Ходжкіна (Hodgkin lymphoma, HL), рак шлунка (gastric cancer, GC), дифузна великоклітинна В-клітинна лімфома (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL), карцинома носоглотки (nasopharyngeal carcinoma, NPC), Т-клітинна лімфома, Т/NK-клітинна лімфома (T- and NK cells lymphoma, NKTL), і пов'язана



Рис. 1. Схематичне зображення відмінностей шляхів IL2-STAT і TGFB-SMAD у нормальних В-клітинах і у В-клітинах при ХЛЛ

зі СНІДом лімфома центральної нервової системи [18–23].

EBV передається через слину, що призводить до продуктивної орофарингеальної інфекції (схематично представлено на рис. 2).

EBV має лінійний дволанцюговий геном ДНК розміром приблизно 170–175 кілобаз, укладений в ікосаедричний капсид діаметром 100–120 нм. Нуклеокапсид оточений тегументом і ліпідною оболонкою з глікопротеїнами. Вірусна ДНК, що містить приблизно 90 рамок зчитування, обмежена кінцевими прямими повторами та розділена на короткі та довгі унікальні домени послідовностей [24].

### ТИПИ ЛАТЕНТНИХ ПРОГРАМ ПРИ ІНФЕКЦІЇ EBV

Існує дві основних форми взаємодії вірусів і клітин хазяїна — продуктивна інфекція, або літичний цикл, коли продукуються нові віруси, а клітина гине, і так звана латентна інфекція, коли вірусний геном дублюється при поділі інфікованих клітин наряду із геном клітини-хазяїна.

Щоб підтримувати інфекцію протягом усього життя, EBV встановлює форму латентної інфекції в циркулюючих В-клітинах, де епісомальна форма вірусного геному зберігається в ядрах В-клітин. Ця латентна фаза характеризується низькими рівнями транскрипції ядерних антигенів вірусу (EBNA), латентних мембранних білків (LMP), малих некодуючих РНК і транскриптів BamHI-A [19, 25, 26]. В основному, експресується тільки EBNA-1, інколи, разом із LMP2A. Важливо відмітити, що у різних злоякісних новоутвореннях EBV використовує різні програми латентності (табл. 1).

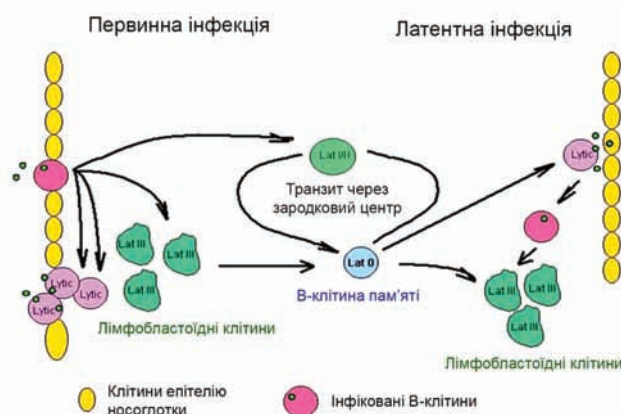


Рис. 2. Схематичне представлення інфекції EBV. Вірус інфікує В-клітини у носоглотці людини, причому активується продуктивний цикл. Після взаємодії з імунною системою людини вірус встановлює латентну інфекцію у В-клітинах пам'яті

Важливо нагадати, що взагалі EBV кодує близько 90 генів, проте для трансформації В-клітини і активної проліферації трансформованої клітини необхідні тільки 6 ядерних протеїнів EBNA і 3 білка LMP. За альтернативною номенклатурою EBNA-3 називається EBNA-3A, EBNA-4 — EBNA-3B, EBNA-5 — EBNA-LP (EBNA-Leader Protein) і EBNA-6 — EBNA-3C. У випадку раку шлунка експресується ще менший набір вірусних генів, як і у випадку карциноми носоглотки і ХЛЛ (див. табл. 1). Схематично функції латентних вірусних білків наведено на рис. 3 (адаптовано із [28]).

EBV потрапляє в В-клітини через рецептор-опосередкований ендцитоз. CD21 служить рецептором для глікопротеїну вірусної оболонки

Таблиця 1

Типи латентних програм EBV

| Тип латентної програми | Експресовані гени                                                                                          | Тип промотора | <i>In vivo</i><br>(в організмі людини, як умовно здорової, так і при певному захворюванні)                                 | <i>In vitro</i><br>(в культурі клітин)                          |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Latency 0              | —                                                                                                          | —             | В-клітини пам'яті                                                                                                          | —                                                               |
| Latency I              | EBNA-1                                                                                                     | Qp            | Зародкові центри, імуномононуклеоз (IM), BL, pleural effusion lymphoma (PEL), GC                                           | Клітинні лінії PEL і BL                                         |
| Latency IIA            | EBNA-1, LMP1, LMP2A, LMP2B                                                                                 | Qp, LMP       | Зародкові центри, IM, HL, NPC                                                                                              | Немає                                                           |
| Latency IIB            | EBNA-1, EBNA-2                                                                                             | Qp, Cp        | Зародкові центри, IM, ХЛЛ                                                                                                  | Немає                                                           |
| Latency III            | EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3 (EBNA-3A), EBNA-4 (EBNA-3B), EBNA-5 (EBNA-LP), EBNA-6 (EBNA-3C), LMP1, LMP2A, LMP2B | Qp, Cp, Wp    | IM, посттрансплантаційні лімфопроліферативні захворювання (posttransplant lymphoproliferative disease, PTLD), СНІД-лімфома | BL, лімфобластні клітинні лінії (lymphoblastoid cell line, LCL) |

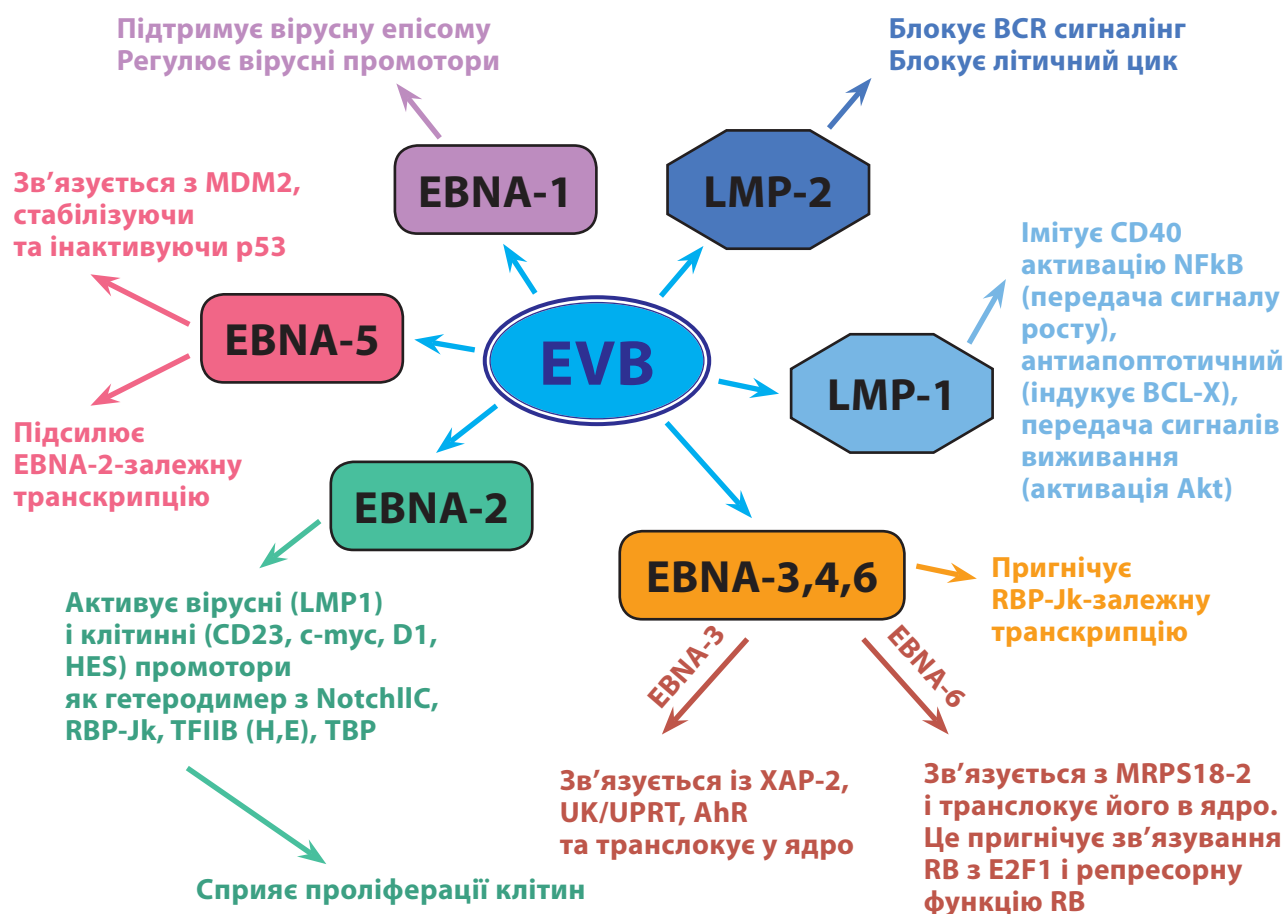


Рис. 3. Сумарна схема функцій латентних білків, кодованих EBV

gp350/220. Взаємодія між gp350/220 і CD21 сприяє прикріпленню EBV до В-клітин, дозволяючи вірусу проникати в клітини. Ця взаємодія має вирішальне значення для початкових стадій інфекції. Парадоксально, але хоча CD21 сприяє проникненню EBV у В-клітини, він також відіграє певну роль у стимулюванні імунної відповіді проти EBV. CD21 є рецептором для компонента комплементу C3d, і коли C3d зв'язується з антигенами, він посилює розпізнавання та поглинання цих антигенів В-клітинами. Цей процес є частиною відповіді імунної системи на патогени [29, 30].

### РОЛЬ ЯДЕРНОГО ПРОТЕЇНА EBNA-2 У ТРАНСФОРМАЦІЇ В-КЛІТИН

Як зазначено вище, основними клітинами-мішенями для інфекції EBV є первинні В-лімфоцити людини, проте вірус може інфікувати будь-які лімфоцити та епітеліальні клітини, що експресують на поверхні молекулу CD21.

Кодовані вірусом ядерні білки EBNA-2, -3, -5 і -6 регулюють транскрипцію клітинних генів, промотори яких активуються факторами транскрипції NOTCH1 і PU.1 (наприклад, гени *C-MYC*, *C-FGR*, циклін D2, *CD21* і *CD23*) [31–33].

Ядерний антиген Епштейна-Барр 2 (EBNA2) є основним транскрипційним фактором, що кодується вірусом EBV. Він керує експресією як вірусних генів, так і генів клітини-хазяїна, тим самим впливаючи на різні клітинні процеси.

У контексті ХЛЛ було показано, що EBNA2 взаємодіє із декількома факторами транскрипції, модулюючи їх активність і сприяючи патогенезу захворювання. EBNA2 не зв'язується із ДНК і тому взаємодіє із клітинними білками, які мають здатність зв'язуватися із специфічними ділянками ДНК, наприклад, із протеїном CBF1. Така білкова взаємодія обумовлює транскрипційну активність протеїна EBNA-2 для активної експресії цільових генів.

За рахунок взаємодії із CBF1 протеїн EBNA2 може посилювати регуляцію таких генів, як *CD21* і *CCR7*, які беруть участь в активації та міграції В-клітин [34]. EBNA2 індукує експресію протоонкогену *C-MYC*, критичного регулятора клітинної проліферації [35]. Так, у всіх В-клітинах при ВЛ детектується активація гена *C-MYC* за рахунок транслокації із генами імуноглобулінів IgG, що відіграє роль у злоякісній трансформації В-клітин.

Фактор транскрипції NFATc1 разом з E2F5 і NR3C2, є одними з найбільш взаємопов'язаних



факторів транскрипції генома при ХЛЛ, і його експресія значно вища в клітинах ХЛЛ порівняно з нормальними В-клітинами [36].

Хоча не має прямих доказів впливу EBNA2 на NFATc1 при ХЛЛ, широке перепрограмування транскрипції, спричинене EBNA2, потенційно може вплинути на активність NFATc1.

Також було показано, що EBNA2 посилює активність BATF, фактора транскрипції, який бере участь у регуляції імунної відповіді. Підвищення транскрипційної активності BATF за допомогою EBNA2 може змінити транскрипційний ландшафт клітин ХЛЛ, потенційно впливаючи на їхнє виживання [37].

Поряд з PU1 під час дозрівання та розвитку В-клітин відбувається взаємодія з декількома кофакторами, включаючи E47, IRF4, IRF8 і STAT6. Таким чином, IRF4 має подвійну функцію, діючи як під час раннього розвитку В-клітин, так і в зрілих В-клітинах під час відповіді зародкового центру після залучення антигену. IRF4 бере участь у складній мережі сигналів, які визначають клітинну долю зрілих В-клітин після залучення антигену для апоптозу або диференціювання плазматичних клітин під час регуляції формування зародкового центру та дозрівання афінності.

Показано, що EBNA2 може підвищувати експресію фактора транскрипції IRF4 шляхом зв'язування зі специфічними елементами енансера вище промотора даного гена. Це зв'язування опосередковується через взаємодію EBNA2 з клітинним фактором транскрипції RBPJ-каппа, що здатний взаємодіяти із специфічною послідовністю ДНК у промоторній ділянці гена *IRF4*. Це підкреслює важливість функціонування EBNA2 у EBV-інфікованих В-клітинах [38].

### РОЛЬ ВІРУСНОГО МЕМБРАННОГО ПРОТЕЇНА LMP1 У ТРАНСФОРМАЦІЇ КЛІТИНИ

Мембранний білок LMP1 активує TNF $\alpha$ /CD40-залежні клітинні сигнальні шляхи, які стимулюють проліферацію та виживання трансформованих клітин (шляхом активації NF $\kappa$ B, а також JUN та p38/MAP кіназ). LMP-2 блокує сигнальні шляхи, які зазвичай контролюються В-клітинним рецептором BCR, а саме імітує активований BCR і взаємодіє з клітинними тирозинкіназами Lyn та Syk через імунорецепторний тирозин-активаційний мотив (ITAM) у своєму N-кінцевому домені. Ця взаємодія блокує нормальну передачу сигналу через BCR, знижуючи рівні Lyn та пригнічуючи фосфорилування тирозину і мобілізацію кальцію після активації рецептора. LMP1 активує шлях MAPK (мітоген-активована протеїнкіназа), що призводить до підвищення активності фактора транскрипції AP-1 (гетеродимера FOS і JUN) [39, 40].

LMP1 імітує передачу сигналів CD40, взаємодіючи з TRAF (фактори, пов'язані з рецептором TNF), що призводить до конститутивної активації шляху NF- $\kappa$ B. TRAF6 і TRAF2 є найбільш важливими для активації NF- $\kappa$ B [41, 42].

LMP1 сприяє експресії антиапоптозних генів (наприклад, *BCL-2*, *c-FLIP*), що може вплинути на виживання клітин ХЛЛ. З такою ж метою для створення імуносупресивного мікрооточення, LMP1 бере участь у стимулюванні синтезу про-запальних цитокінів (наприклад, IL-6 і IL-10). За участі таких цитокінів LMP1 активує STAT3 за допомогою аутокринного та паракринного сигналіngu. Пряма взаємодія з кіназами JAK також активує фактор транскрипції STAT3. STAT3 активує транскрипцією генів, пов'язаних із виживанням і проліферацією (наприклад, *C-MYC*, *VEGF*) [43–45].

LMP1 взаємодіє з IRF7, щоб модулювати передачу сигналів інтерферону. Так, LMP1 відіграє важливу роль у пригніченні IRF-залежної противірусної відповіді, щоб уникнути імунного виявлення. Це порушує контроль імунної системи над EBV-інфікованими та трансформованими злоякісними клітинами [46].

LMP1 опосередковано підвищує активність C-MYC через NF- $\kappa$ B і активацію STAT3. Стимуляція проліферації шляхом посилення метаболічної та транскрипційної активності В-клітин корелює з особливостями агресивних онкогематологічних захворювань [43].

Показано, що LMP1 стабілізує HIF-1 $\alpha$  за нормоксичних умов, можливо, через шляхи NF- $\kappa$ B та PI3K/АКТ, що також сприяє перепрограмуванню метаболізму та адаптації до гіпоксичного мікрооточення солідних пухлин, таких, як карцинома носоглотки [47].

Загалом, EBV-модульовані механізми імунного ухилення створюють сприятливе для пухлин мікрооточення, захищаючи клітини ХЛЛ від імунної атаки.

### СУЧАСНІ ЛІКАРСЬКІ ЗАСОБИ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ХЛЛ

В принципі, всі сучасні лікарські засоби, які використовують у клінічних умовах для хворих на ХЛЛ, ґрунтуються на їх здатності блокувати певні клітинні сигнальні шляхи. Слід відзначити, що часто пацієнти з ХЛЛ не потребують такого лікування, тому що більшість клітинних сигнальних шляхів, особливо тих, що індукують апоптоз, не є активними у В-клітинах при ХЛЛ [48–52]. Детальний опис ряду хімічних сполук і сигнальних шляхів наведено у *табл. 2*.

Проте, як обговорено раніше, це все допущення за умов активності даних клітинних сигнальних шляхів у клітинах ХЛЛ. Як і ж ланки наведених та інших сигнальних шляхів інактивовано та/або блоковано у клітинах ХЛЛ?

Клітинні сигнальні каскади, на які спрямовано хеміотерапію хворих на ХЛЛ

| Сигнальні каскади                         | NF-κB                                                                                                             | PI3K/AKT/mTOR                                                                                | JAK/STAT                                                                                                          | BCR                                                                                                                                         | BCL-2                                                                                               |
|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Механізм при трансформації клітин загалом | Шлях NF-κB активується через LMP1                                                                                 | Шлях PI3K/AKT, активується через BHRF1-1 і BART2-5p, які можуть одночасно пригнічувати LZTS2 | Активується шлях JAK/STAT, що призводить до збільшення транскрипції генів, які беруть участь у проліферації       | Активується В-клітинний рецептор, BCR                                                                                                       | Підвищується рівень BCL-2, антиапоптозного білка, що сприяє виживанню клітин ХЛЛ                    |
| Ймовірне терапевтичне втручання           | Інгібітори протеасом, наприклад, бортезоміб, можуть інгібувати активність NF-κB, індукуючи апоптоз у клітинах ХЛЛ | Інгібітори PI3K, такі як іделалізіб                                                          | Інгібітори JAK, такі як руксолітиніб, можуть порушити передачу сигналів, потенційно контролюючи прогресування ХЛЛ | Інгібітори BTK (Bruton Tyrosin kinase), такі як ібрутиніб, пригнічують передачу сигналів BCR, що призводить до зниження проліферації клітин | Інгібітори BCL-2, такі як венето-клас, сприяють апоптозу в клітинах ХЛЛ, націлюючись на білок BCL-2 |

ГІПОТЕТИЧНИЙ СПОСІБ  
ЗНАХОДЖЕННЯ ЗАГУБЛЕНОЇ ЛАНКИ —  
КЛІТИННОГО ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦІЇ

Щоб відповісти на поставлене вище питання, треба звернути увагу, що такий трансформуючий агент В-клітин, як EBV, при інфікуванні клітин ХЛЛ не призводить до їх проліферації навіть *in vitro*. Причому інфіковані клітини ХЛЛ експресують програму латентності ІВ, тобто експресуються протеїни EBNA-1 і EBNA-2, проте не експресується ген *LMP1*. Відомо, що промотор гену *LMP1* може активуватися як гетеродимерами, в яких є вірусний білок EBNA-2, наприклад, із NOTCH1, RBPj-карра і PU.1, так і гомо/гетеродимерами клітинних факторів транскрипції, наприклад, субодиниць NFκB — RELA-RELB або RELB-RELB, а також ATF2-c-JUN і PAX5-TFAP2.

Варто відзначити, що згідно з нашими даними, експресія TFAP2 майже в 20 разів нижча в клітинах ХЛЛ порівняно з нормальними В-клітинами, активованими анти-CD40 та IL4 [14].

Також, як ми обговорювали вище, шляхи TGFB-SMAD2/3 та IL-2-STAT2/5 (JAK-STAT5) не функціонують на базальному рівні в В-лімфоцитах пацієнтів із ХЛЛ. Це пов'язано з дуже низькою експресією SMAD2 і відсутністю гетеродимерів SMAD3-SMAD4 в ядрі. Сигнальний шлях IL-2-STAT (JAK-STAT5) інгібується на базальному рівні в клітинах ХЛЛ, швидше за все, через низькі рівні фосфорилування або його повну відсутність [14].

Тобто, якщо знайти відсутню ланку (клітинний фактор транскрипції), що зазвичай бере участь у трансформації нормальних В-клітин, можна спробувати привести В-клітини ХЛЛ до реакційного стану за рахунок екзогенної експресії тако-

го протеїна. Тоді можна сподіватися на відповідь В-клітин ХЛЛ на сигнали, які індукують апоптоз, кращі результати при хіміотерапії, тощо. Гіпотезу можна перевірити при інфекції EBV В-клітин ХЛЛ, які експресують екзогенний ідентифікований фактор транскрипції, *in vitro*. Прогнозується, що за таких умов інфіковані В-клітини ХЛЛ будуть проліферувати *in vitro* та реагувати на зовнішні сигнали, що індукують апоптоз.

Вивчення молекулярних механізмів регуляції клітинних сигнальних шляхів у В-лімфоцитах при ХЛЛ є фундаментальною основою для подальшого використання отриманих даних у пошуку потенційних мішеней впливу та розробці методів індивідуалізованої терапії.

Робота виконана в межах гранту № 0124U003787 НФДУ “Активізація сигнальних каскадів для елімінації трансформованих В-клітин при хронічному лімфолейкозі”.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Cancer in Ukraine, 2022–2023. Incidence, mortality, prevalence and other relevant statistics. Bulletin of the National Cancer Registry of Ukraine. Kyiv, 2024. 25. [http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL\\_25/index.htm](http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_25/index.htm).
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. CA Cancer J Clin 2020; **70** (1): 7–30. doi: 10.3322/caac.21590.
3. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. CA Cancer J Clin 2023; **73** (1): 17–48. doi: 10.3322/caac.21763.
4. Rozovski U, Keating MJ, Estrov Z. Why Is the immunoglobulin heavy chain gene mutation status a prognostic indicator in chronic lymphocytic leukemia? Acta Haematol 2018; **140** (1): 51–54. doi: 10.1159/000491382.
5. Scarfò L, Dagklis A, Scielzo C, et al. CLL-like monoclonal B-cell lymphocytosis: are we all bound to have it?

- Semin Cancer Biol 2010; **20** (6): 384–90. doi: 10.1016/j.semcancer.2010.08.005.
6. **Fabbri G, Dalla-Favera R.** The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2016; **16** (3): 145–62. doi: 10.1038/nrc.2016.8.
  7. **Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, et al.** The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* 2022; **36** (7): 1720–48. doi: 10.1038/s41375-022-01620-2.
  8. **Rammal, S, Semaan, W, Aprahamian N, et al.** Spotlight on borderline-IGHV mutational status in chronic lymphocytic leukemia. *Front Oncol* 2024; **14**, 1430225. doi: 10.3389/fonc.2024.1430225
  9. **Stamatopoulos, B, Timbs A, Bruce D, et al.** Targeted deep sequencing reveals clinically relevant subclonal IgHV rearrangements in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2017; **31**: 837–845. doi: 10.1038/leu.2016.307.
  10. **Cerhan JR, Slager SL.** Familial predisposition and genetic risk factors for lymphoma. *Blood* 2015; **126** (20): 2265–73. doi.org/10.1182/blood-2015-04-537498.
  11. **Cerreto M, Foà, R, Natoni A.** The role of the microenvironment and cell adhesion molecules in chronic lymphocytic leukemia. *Cancers* 2023; **15**: 5160. doi: 10.3390/cancers15215160.
  12. **Hacken TE, Burger JA.** Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: Implications for disease pathogenesis and treatment. *Biochim Biophys Acta* 2016; **1863** (3): 401–13. doi: 10.1016/j.bbamer.2015.07.009.
  13. **Zent CS, Burack WR.** Mutations in chronic lymphocytic leukemia and how they affect therapy choice: focus on NOTCH1, SF3B1, and TP53. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2014; **5** (1): 119–24. doi: 10.1182/asheducation-2014.1.119.
  14. **Matvieieva AS, Kovalevska LM, Polishchuk OS.** Expression profile of transcription factors in the blood samples of patients with the chronic lymphocytic leukemia. *Oncology* 2016; **18** (4): 311–6. (in Ukrainian)
  15. **Epstein MA, Achong BG, Barr YM.** Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1964; **1** (7335): 702–3.
  16. **Cruchley AT, Williams DM, Niedobitek G, Young LS.** Epstein-Barr virus: biology and disease. *Oral Dis* 1997; **3** (1): S156–63. doi: 10.1111/j.1601-0825.1997.tb00351.x.
  17. **Williams H, Crawford DH.** Epstein-Barr virus: the impact of scientific advances on clinical practice. *Blood* 2006; **107** (3): 862–9. doi: 10.1182/blood-2005-07-2702.
  18. **Murray PG, Young LS.** An etiological role for the Epstein-Barr virus in the pathogenesis of classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2019; **134** (7): 591–6. doi: 10.1182/blood.2019000568.
  19. **Young LS, Rickinson AB.** Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 2004; **4** (10): 757–68. doi: 10.1038/nrc1452.
  20. **Cohen JI.** Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med* 2000; **343** (7): 481–92. doi: 10.1056/NEJM200008173430707.
  21. **Raab-Traub N.** Epstein-Barr virus in the pathogenesis of NPC. *Semin Cancer Biol* 2002; **12** (6): 431–41. doi: 10.1016/S1044-579X(02)00056-4.
  22. **Kimura H, Ito Y, Kawabe S, et al.** Epstein-Barr virus-associated T/natural killer-cell lymphoproliferative diseases. *Blood* 2012; **119** (23): 5968–77. doi: 10.1182/blood-2011-12-404939.
  23. **Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z.** Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes & Development* 2018; **32** (19–20): 1267–84. doi: 10.1101/gad.314617.118.
  24. **Lee CP, Chen MR.** Conquering the Nuclear Envelope Barriers by EBV Lytic Replication. *Viruses*. 2021; **13** (4): 702. doi: 10.3390/v13040702.
  25. **Gandhi MK, Tellam JT, Khanna R.** Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 2004; **125** (3): 267–81. doi: 10.1111/j.1365-2141.2004.04902.x.
  26. **Küppers R.** B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol* 2003; **3** (10): 801–12. doi: 10.1038/nri1202.
  27. **Ambinder RF, Weiss LM.** Association of Epstein-Barr virus with Hodgkin's disease. In: Mauch PM, Armitage JO, Diehl V, et al. *Hodgkin's Disease*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p. 79–98.
  28. **Klein E, Kis LL, Klein G.** Interaction of Epstein-Barr virus (EBV) with human B-lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; **396** (1): 67–73. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.04.079.
  29. **Fingerroth JD, Weissman D, Tedder TF, et al.** Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Science* 1984; **234** (4781): 1096–9. doi: 10.1126/science.6098287.
  30. **Fearon DT, Carroll MC.** Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex. *Ann Rev Immunol* 2000; **18**: 393–422. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.393.
  31. **Zimber-Strobl U, Kremmer E, Grässer FA, et al.** The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 interacts with an EBNA2 responsive cis-element of the terminal protein 1 gene promoter. *EMBO J* 1993; **12** (1): 167–75. doi: 10.1002/j.1460-2075.1993.tb05642.x.
  32. **Saha A, Robertson ES.** Impact of EBV essential nuclear protein EBNA-3C on B-cell proliferation and apoptosis. *Future Microbiol* 2013; **8** (3): 323–52. doi: 10.2217/fmb.12.147.
  33. **Zhao B, Marshall DR, Sample CE.** A conserved domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-3A is essential for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* 1996; **70** (4): 2557–65. doi: 10.1128/jvi.70.4.2557-2565.1996.
  34. **Mohan J, Dement-Brown J, Maier S, et al.** Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces FcRH5 expression through CBF1. *Blood* 2006; **107** (11): 4433–9. doi: 10.1182/blood-2005-09-3815.
  35. **Bornkamm GW, Kempkes B.** The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol* 1999; **73** (5): 4481–4. doi: 10.1128/JVI.73.5.4481-4484.1999.
  36. **Sana I, Mantione ME, Angelillo P, Muzio M.** Role of NFAT in chronic lymphocytic leukemia and other B-cell malignancies. *Front Oncol* 2021; **11**: 666474. doi: 10.3389/fonc.2021.666474.
  37. **Zhou S, Fujimuro M, Hsieh J, et al.** A role for SKIP In EBNA2 activation of CBF1-Repressed promoters. *J Virol* 2000; **74** (4): 1939–47. doi: 10.1128/jvi.74.4.1939-1947.2000.
  38. **Zhao B, Marshall DR, Sample CE.** A conserved domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-3A is essential for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* 1996; **70** (4): 2557–65. doi: 10.1128/jvi.70.4.2557-2565.1996.
  39. **Thorley-Lawson DA, Gross A.** Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med* 2004; **350** (13): 1328–37. doi: 10.1056/NEJMra032015.
  40. **Caldwell RG, Wilson JB, Anderson SJ, Longnecker R.** Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* 1998; **9** (3): 405–11. doi: 10.1016/S1074-7613-(00)80623-3.
  41. **Schultheiss U, Puschner S, Kremmer E, et al.** TRAF6 is a critical regulator of LMP1 functions in vivo. *Int Immunol* 2014; **26** (3): 149–59. doi: 10.1093/intimm/dxt062.

42. **Kaye KM, Izumi KM, Kieff E.** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90** (19): 9150–4. doi: 10.1073/pnas.90.19.9150.
43. **Kilger E, Kieser A, Baumann M, Hammerschmidt W.** Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *EMBO J* 1998; **17** (6): 1700–9. doi: 10.1093/emboj/17.6.1700.
44. **Zhang L, Pagano JS.** Interferon regulatory factor 7 mediates activation of Tap-2 by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *J Virol* 2001; **75** (7): 341–50. doi: 10.1128/JVI.75.7.341-350.2001.
45. **Niu G, Wright KL, Ma Y, et al.** Role of Stat3 in regulating p53 expression and function. *Mol Cell Biol* 2005; **25** (17): 7432–40. doi: 10.1128/MCB.25.17.7432-7440.2005.
46. **Ning S, Pagano JS, Barber GN.** IRF7: activation, regulation, modification, and function. *Genes Immun* 2011; **12** (6): 399–414. doi: 10.1038/gene.2011.21.
47. **Kondo S, Seo SY, Yoshizaki T, et al.** EBV latent membrane protein 1-induced VEGF production is associated with increased HIF-1 $\alpha$  expression mediated by the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Cancer Res* 2006; **66** (16): 8357–64. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1201.
48. **Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, et al.** Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res* 1999; **59** (11): 2615–22. PMID: 10363983.
49. **Fruman DA, Rommel C.** PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2014; **13** (2): 140–56. doi: 10.1038/nrd4204.
50. **Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, et al.** A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. *N Engl J Med* 2012; **366** (9): 799–807. doi: 10.1056/NEJMoa1110557.
51. **Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, et al.** Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2013; **369** (1): 32–42. doi: 10.1056/NEJMoa1215637.
52. **Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, et al.** Targeting BCL2 with venetoclax in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2016; **374** (4): 311–22. doi: 10.1056/NEJMoa1513257.

## CONCERNING THE LATENT INFECTION PROGRAMS OF EPSTEIN-BARR VIRUS IN B-CELLS OF CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

*L. Kovalevska<sup>1</sup>, A. Matveeva<sup>1</sup>, I. Tytorenko<sup>2</sup>, I. Kryachok<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> *RE Kavetsky Institute of experimental pathology, oncology and radiobiology of National Academy of sciences of Ukraine,*

<sup>2</sup> *The state non-profit enterprise “National Cancer Institute”, Kyiv, Ukraine*

*The treatment of hematological diseases is one of the most complex problems of modern medicine. It is known that humoral immunity is based on B-lymphocytes, which at the terminal stages of differentiation turn into antibody-forming immunoblasts and plasma cells. Chronic lymphocytic leukemia (CLL) develops with a significant increase in phenotypically mature but immunocompetent B lymphocytes, that are characterized by the presence of atypical patterns of marker expression. The reasons for*

*the inhibition of the cell signaling pathway responsible for proliferation and apoptosis in mature B lymphocytes of patients with CLL are extremely important, but still poorly understood. In-depth analysis of the key players of signaling cascades and transcription factors that are functionally suppressed in CLL will improve the prognosis of the disease and help develop personalized treatment for such patients.*

**Keywords:** chronic lymphocytic leukemia, transcription factors, apoptosis, nuclear antigens EBNA, EBNA-2, membrane proteins LMP, LMP-1, malignant transformation, proliferation

### Адреса для листування:

Л.М. Ковалевська  
03022, Київ, вул. Васильківська, 45  
Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України  
E-mail: kreyl@yahoo.com

Одержано: 28.11.2024