

Уткин О. В.^{1,2}, Старикова В. Д.^{1,2}, Новиков В. В.^{1,2}

Встречаемость сплайсированных вариантов матричной РНК DR3/LARD при герпес-вирусной инфекции

¹ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 603950, г. Нижний Новгород; ²«НИИ молекулярной биологии и региональной экологии ФГБОУ ВПО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», Министерства образования и науки РФ, 603950, г. Нижний Новгород

Цель данного исследования – анализ встречаемости мРНК мембранных и растворимых форм DR3/LARD в крови при герпес-вирусной инфекции (ГВИ) разной этиологии. С помощью метода ОТ-ПЦР показано, что в крови здоровых волонтеров и пациентов с ГВИ с разной частотой выявлялись четыре формы мРНК DR3/LARD. Две формы кодировали мембранные молекулы (мРНК LARD 1а, мРНК DR3β), а две другие соответствовали растворимым формам рецептора (мРНК LARD 3, мРНК soluble DR3β). встречаемость мРНК soluble DR3β по сравнению с таковой у здоровых волонтеров снижалась при инфицировании вирусом ветряной оспы и не менялась при инфицировании вирусом Эпштейна–Барр и цитомегаловирусом. В целом изменения в частоте выявления сплайсированных вариантов мРНК DR3/LARD направлены на модуляцию апоптоза и сдерживание противовирусного иммунного ответа.

Ключевые слова: апоптоз; рецепторы смерти; DR3/LARD; мРНК; герпес-вирусная инфекция.

Для цитирования: Вопросы вирусологии 2014; 59(6): 36–38.

Frequency of the occurrence of spliced variants of the messenger RNA DR3/LARD in herpesviral infection

Utkin O. V.^{1,2}, Starikova V. D.^{1,2}, Novikov V. V.^{1,2}

¹Blokhina Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Nizhny Novgorod, 603950, Nizhny Novgorod, Russia; ²Institute of Molecular Biology and Regional Ecology, Lobachevsky Nizhny Novgorod State University, 603950, Nizhny Novgorod, Russia

Analysis of frequency of the occurrence of membrane and soluble forms of the mRNA DR3/LARD in blood in herpesviral infection of various etiology was studied. Four forms of the mRNA DR3/LARD were detected with various frequencies in blood cells of healthy volunteers. Patients with herpesviral infection of various etiology were studied using RT-PCR. Two forms encoded membrane molecules (mRNA LARD 1a, mRNA DR3β) and two other forms accorded soluble forms of receptor (mRNA LARD 3, mRNA soluble DR3β). It was revealed that the frequency of the occurrence of mRNA soluble DR3β form decreased in patients with the varicella zoster virus (VZV) infection in comparison with healthy volunteers. However, the patients with the Epstein-Barr virus (EBV) and cytomegalovirus (CMV) infection did not display significant change in occurrence of mRNA soluble DR3β form. As a whole, changes in frequency of occurrence of spliced variants of mRNA DR3/LARD are directed toward modulation of apoptosis and restraint antiviral immune response.

Key words: apoptosis, death receptor; DR3/LARD; herpesviral infection; mRNA.

Citation: *Voprosy virusologii*. 2014; 59(6): 36–38. (In Russ.)

Представители семейства Herpesviridae широко распространены в разных регионах мира и вызывают хроническую персистирующую инфекцию [1]. Важным механизмом иммунорезистентности герпес-вирусов является способность модулировать апоптоз инфицированных и иммунокомпетентных клеток [2–5]. Поэтому изучение молекулярных механизмов иммунного ответа и апоптоза при данной инфекции весьма актуально.

В инициации внешнего пути апоптоза участвуют представители белкового семейства рецепторов смерти [5]. Одним из них является трансмембранный рецептор DR3/LARD. Он экспрессируется на поверхности лейкоцитов периферической крови, а также в тканях, содержащих лимфоидные элементы (толстая и тонкая кишка, тимус, селезенка). В зависимости от типа клеток стимуляция DR3/LARD приводит к апоптозу или пролиферации [6].

Для рецептора DR3/LARD описано 14 вариантов мРНК, образующихся в результате альтернативного сплайсинга. Среди них выделяют мембранные (4 мРНК) и растворимые (10 мРНК) формы, выполняющие разные функции [6]. Предполагается, что растворимые формы DR3/LARD ингибируют апоптоз, инициированный с помощью мем-

бранных форм рецептора [7]. Такое разнообразие форм мРНК DR3/LARD предполагает наличие множества путей модуляции пусковых событий апоптоза в рамках противодействия иммунной системы организма хозяина и вирусных патогенов.

Цель работы – анализ встречаемости мРНК мембранных и растворимых форм DR3/LARD в крови при инфицировании разными представителями семейства Herpesviridae.

Материалы и методы

Исследуемый материал. Исследовали периферическую кровь у 94 пациентов (44 мужчины и 50 женщин) с диагнозом герпес-вирусной инфекции (ГВИ), поступивших на лечение в Городскую инфекционную больницу № 2 г. Нижнего Новгорода. Возраст пациентов составил от 18 до 81 года (средний возраст 36 лет). Инфекцию, вызываемую вирусом ветряной оспы (ВВО), выявили у 29 больных из 94, вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ) – у 37 из 94, цитомегаловирусом (ЦМВ) – у 19 из 94; у 9 из 94 наблюдали смешанную форму инфицирования (ВВО и ЦМВ). В качестве контроля использовали 40 образцов крови здоровых лиц (20 мужчин и 20 женщин) в возрасте от 18

Встречаемость (в %) сплайсированных вариантов мРНК DR3/LARD в крови здоровых лиц и пациентов с ГВИ

Форма мРНК DR3/LARD	Здоровые лица			Пациенты с ГВИ				
	мужчины	женщины	всего	ВВО	ВЭБ	ЦМВ	микстин- фекция	всего
DR3β	70 (14/20)	80 (16/20)	75 (30/40)	72 (21/29)	73 (27/37)	79 (15/19)	78 (7/9)	74 (70/94)*
soluble DR3β	80 (16/20)	70 (14/20)	75 (30/40)	48 (14/29)***	59 (22/37)	58 (11/19)	56 (5/9)	55 (52/94)***
LARD 1a	95 (19/20)**	90 (18/20)	93 (37/40)**,*	90 (26/29)*	95 (35/37)*,**	79 (15/19)	78 (7/9)	88 (83/94)*,**
LARD 3	95 (19/20)**	75 (15/20)	85 (34/40)	93 (27/29)*, **, ****	81 (30/37)*	68 (13/19)	100 (9/9)*	84 (79/94)*

Примечание. * – статистически значимые различия по сравнению с мРНК soluble DR3β ($p < 0,05$); ** – статистически значимые различия по сравнению с мРНК DR3β ($p < 0,05$); *** – статистически значимые различия во встречаемости мРНК soluble DR3β по сравнению с таковой у здоровых лиц ($p < 0,05$); **** – статистически значимые различия в частоте выявления мРНК LARD 3 при инфицировании ВВО по сравнению с таковой при ЦМВ ($p < 0,05$).

до 75 лет (средний возраст 41 год). В крови здоровых волонтеров методом полимеразно-цепной реакции (ПЦР) не детектировали ДНК вируса в клинически значимых концентрациях. Это принципиальное отличие и легло в основу разделения групп на здоровых лиц и больных.

Выделение тотальной РНК проводили с помощью коммерческого набора «РИБО-сорб» в соответствии с инструкцией производителя (ООО «Интерлабсервис», Москва).

ОТ-ПЦР. Для синтеза комплементарной ДНК (кДНК) на матрице мРНК проводили реакцию обратной транскрипции по стандартной схеме [8]. В реакции использовали обратный праймер DR3R6 (5'-CAgCgCTTgAgCATCTCgTA-3'). Полученную кДНК амплифицировали в два раунда. В первом раунде проводили 30 циклов с помощью праймеров – прямого DR3F0 (5'-gTgACTTCCACAaAgATT-3') и обратного DR3R6 – при следующих температурных условиях: 94°C – 30 с, 50°C – 30 с, 72°C – 50 с. Во втором раунде для одновременной детекции мРНК мембранных и растворимых форм DR3/LARD проводили 25 циклов ПЦР с прямым праймером DR3F1S (5'-CTgggAgAACCACCATAATT-3'), а также с обратными праймерами DR3R3b (5'-gAACACACCTACTCTgCCTC-3') и DR3TMR4 (5'-CCCAGTTCATCTgCAGTAA-3') при следующих температурных условиях: 94°C – 30 с, 62°C – 30 с, 72°C – 40 с.

Для детекции продуктов, образовавшихся в ходе двух раундов ПЦР, проводили электрофорез в 2% агарозном геле, содержащем бромид этидия.

Секвенирование ДНК. При подготовке к секвенированию фрагменты кДНК вырезали из агарозного геля, очищали с использованием набора DNA Extraction Kit («Fermentas», Латвия) и проводили реакцию терминирования, используя набор BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit («Applied Biosystems», США), согласно рекомендациям производителя. Результаты реакции регистрировали на генетическом анализаторе ABI Prizm 3130 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США). Нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями мРНК мембранных и растворимых форм DR3/LARD, зарегистрированными в базе данных NCBI GenBank (AF026070.1, AF026071.1, U94501.1, U94504.1).

Статистический анализ. Для статистической обработки данных использовали пакет программ Statistica 8.0. Сравнивали относительные частоты исследуемых признаков в группах. Для анализа взаимосвязи выявления различных вариантов мРНК DR3/LARD в зависимости от пола и типа инфекционного агента использовали двусторонний тест критерия Фишера. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Встречаемость мРНК DR3/LARD в крови здоровых лиц

В крови здоровых лиц с разной частотой наблюдали четыре варианта мРНК DR3/LARD (см. таблицу). Две

мРНК кодировали мембранные молекулы (мРНК LARD 1a, мРНК DR3β), а две другие – растворимые формы рецептора (мРНК LARD 3, мРНК soluble DR3β). Всего в исследованных образцах крови здоровых лиц выявили 10 спектров форм.

В целом среди здоровых лиц мРНК LARD 1a выявляли в 1,2 раза чаще, чем мРНК DR3β и мРНК soluble DR3β ($p = 0,031$). У мужчин и женщин сплайсированные варианты мРНК DR3/LARD обнаруживали приблизительно с одинаковой частотой. Только у мужчин мРНК LARD 1a и мРНК LARD 3 детектировали в 1,4 раза чаще, чем мРНК DR3β ($p = 0,044$). При этом статистически значимые ассоциации в частоте выявления различных форм мРНК DR3/LARD с полом здоровых лиц отсутствовали.

Встречаемость мРНК DR3/LARD в крови при ГВИ

В крови пациентов с ГВИ с разной частотой выявляли четыре варианта мРНК DR3/LARD (см. таблицу). Эти же варианты мРНК детектировали в крови здоровых лиц. Всего у инфицированных лиц обнаружили девять спектров форм мРНК DR3/LARD.

В целом при ГВИ мРНК LARD 1a, мРНК LARD 3 и мРНК DR3β выявляли в 1,6 раза, в 1,5 раза и в 1,3 раза чаще, чем мРНК soluble DR3β ($p < 0,05$). Встречаемость мРНК LARD 1a в 1,2 раза оказалась выше, чем мРНК DR3β ($p = 0,02$). Также мРНК soluble DR3β определяли в 1,4 раза реже, чем у здоровых лиц ($p = 0,035$).

При инфицировании ВВО мРНК LARD 3 и мРНК LARD 1a выявляли в 1,9 раза чаще, чем мРНК soluble DR3β ($p < 0,001$ и $p = 0,001$ соответственно). Инфицирование данным вирусом сопровождалось повышением в 1,3 раза частоты выявления мРНК LARD 3 над мРНК DR3β ($p = 0,01$). Кроме того, при инфицировании ВВО мРНК LARD 3 определяли в 1,4 раза чаще, чем при инфицировании ЦМВ ($p = 0,045$). Наблюдали снижение в 1,6 раза встречаемости мРНК soluble DR3β по сравнению с таковой среди здоровых лиц ($p = 0,041$). При ВЭБ-инфекции встречаемость мРНК LARD 1a в 1,6 и в 1,3 раза оказалась выше, чем мРНК soluble DR3β и мРНК DR3β ($p < 0,001$; $p = 0,014$ соответственно). Кроме того, мРНК LARD 3 выявляли в 1,4 раза чаще, чем мРНК soluble DR3β ($p = 0,046$). При инфицировании ЦМВ различий в частоте детекции сплайсированных вариантов мРНК DR3/LARD не обнаружили. При микстинфекции (ВВО и ЦМВ) встречаемость мРНК LARD 3 в 1,8 раза была выше, чем мРНК soluble DR3β ($p = 0,038$). При ВЭБ-инфекции, микстинфекции, а также при инфицировании ЦМВ различий в частоте выявления сплайсированных вариантов мРНК DR3/LARD в сравнении с таковой среди здоровых лиц не отметили.

Обсуждение

Физиологическая роль рецептора DR3/LARD до конца не известна. Показано, что DR3/LARD является важной ко-стимуляторной молекулой при активации CD4-позитивных Т-лимфоцитов [9], а также участвует в регуляции негативной селекции тимоцитов в тимусе [10]. Для дальнейшего

понимания вклада DR3/LARD в работу иммунокомпетентных клеток мы провели анализ встречаемости сплайсированных вариантов мРНК исследуемого рецептора у здоровых лиц. В целом превалировала встречаемость мРНК LARD 1a и мРНК LARD, а не с мРНК soluble DR3 β и мРНК DR3 β , и прежде всего у мужчин. Вероятно, такой набор мРНК DR3/LARD обуславливает физиологическую регуляцию начальных этапов апоптоза.

Функциональная роль рецептора DR3/LARD в регуляции иммунного ответа и апоптоза при ГВИ до конца не выяснена. Литературные источники свидетельствуют о ключевой роли DR3/LARD в формировании протективного и пролонгированного иммунитета на ЦМВ-инфекцию у мышей [10]. Демонстрируется, что инфицирование ЦМВ приводит к усилению экспрессии этого рецептора цитотоксическими CD8-позитивными Т-лимфоцитами. Отсутствие экспрессии рецептора DR3/LARD вследствие нокаута гена сопровождалось неконтролируемой репликацией вируса. Данные об участии DR3/LARD в патогенезе других нозологических форм ГВИ в доступной литературе отсутствуют.

Мы показали, что по разнообразию форм мРНК DR3/LARD ГВИ соответствовала показателям у здоровых лиц. При этом частота выявления отдельных вариантов мРНК DR3/LARD варьировала и имела специфические черты. Так, в крови пациентов наблюдали снижение в 1,4 раза встречаемости мРНК soluble DR3 β по сравнению с таковой среди здоровых лиц. Возможно, что данная форма мРНК DR3/LARD является важным регуляторным фактором, отсутствие которого способствует уходу вируса от иммунологического контроля. Т. е. снижение частоты выявления мРНК soluble DR3 β , проявляющей антиапоптотическую направленность, может способствовать повышению восприимчивости иммунокомпетентных клеток к апоптозу, последующему уменьшению их количества и возникновению иммунодефицита.

Также можно предположить, что этиология возбудителя будет определять механизм модуляции апоптоза с участием сплайсированных вариантов DR3/LARD и результат иммунных реакций. Возможной составной частью такого механизма являются снижение встречаемости мРНК soluble DR3 β при инфицировании ВВО в сравнении с таковой среди здоровых лиц и отсутствие различий в отношении других нозологических форм ГВИ на общем фоне гетерогенной экспрессии сплайсированных вариантов мРНК DR3/LARD. Полученные результаты дополняют и расширяют существующие представления, согласно которым инфицирование ВВО сопровождается усилением апоптоза Т-лимфоцитов *in vitro* [3]. Напротив, инфицирование ЦМВ и ВЭБ-инфекция характеризуются ингибированием апоптоза Т- и В-лимфоцитов, соответственно [4, 5]. В то же время отсутствие различий в частоте выявления сплайсированных вариантов мРНК DR3/LARD при инфицировании ЦМВ и ВЭБ может свидетельствовать о неучастии данного рецептора в реализации стратегий иммунорезистентности, используемых данными вирусами. Известно, что инфицирование ЦМВ и ВЭБ приводит к синтезу клеткой белков, проявляющих антиапоптотические функции, которые по механизму действия сходны с Bcl-2 [2]. Возможно, что модуляция апоптоза и иммунного ответа в случае ВВО достигается при участии рецептора DR3/LARD, а для ЦМВ и ВЭБ ключевыми являются иные способы ухода от иммунного надзора.

Заключение

Показано, что ГВИ сопровождалась изменениями в составе сплайсированных вариантов мРНК DR3/LARD и частоте их детекции как среди инфицированных лиц, так и в сравнении с таковыми у здоровых лиц. В

значительной мере они касались ВВО и проявлялись в снижении частоты выявления мРНК soluble DR3 β . При инфицировании ЦМВ и ВЭБ таких различий не обнаружили. В целом изменения в частоте выявления сплайсированных вариантов мРНК DR3/LARD направлены на модуляцию сигнальных событий апоптоза и сдерживание противовирусного иммунного ответа.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. и РФФИ (проект № 11-04-97088р_поволжье_a).

ЛИТЕРАТУРА

1. Вотяков В.И., Коломиец А.Г., ред. *Генерализованная герпетическая инфекция: факты и концепция*. Мн: Наука и техника; 1992.
2. Brune W. Inhibition of programmed cell death by cytomegaloviruses. *Virus Res.* 2011; 157 (2): 144–50.
3. König A., Hömme C., Hauröder B. The varicella-zoster virus induces apoptosis *in vitro* in subpopulations of primary human peripheral blood mononuclear cells. *Microbes Infect.* 2003; 5 (10): 879–89.
4. Van de Berg P.J., Yong S.L., Remmerswaal E.B., van Lier R.A., ten Berge I.J. Cytomegalovirus-induced effector T cells cause endothelial cell damage. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012; 19 (5): 772–9.
5. Wang J.J., Li Y.F., Jin Y.Y., Wang X., Chen T.X. Effects of Epstein-Barr virus on the development of dendritic cells derived from cord blood monocytes: an essential role for apoptosis. *Braz. J. Infect. Dis.* 2012; 16 (1): 19–26.
6. Уткин О.В., Новиков В.В. Рецепторы смерти в модуляции апоптоза. *Успехи современной биологии*. 2012; 132 (4): 381–90.
7. Porquet N., Poirier A., Houle F., Pin A.L., Gout S., Tremblay P.L. et al. Survival advantages conferred to colon cancer cells by E-selectin-induced activation of the PI3K-NF κ B survival axis downstream of Death receptor-3. *BMC Cancer.* 2011; 11: 285.
8. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Синтез и клонирование кДНК. В кн.: Баев А.А., Скрябин К.Г., ред. *Молекулярное клонирование*. М.: Мир; 1984: 205–38.
9. Qin T. Upregulation of DR3 expression in CD4 T cells promotes secretion of IL-17 in experimental autoimmune uveitis. *Mol. Vis.* 2011; 17: 3486–93.
10. Twohig J.P., Marsden M., Cuff S. M., Ferdinand J.R., Gallimore A.M., Perks W.V. et al. The death receptor 3/TL1A pathway is essential for efficient development of antiviral CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T-cell immunity. *FASEB J.* 2012; 26 (8): 3575–86.

Получена 22.06.13

REFERENCES

1. Votyakov V.I., Kolomiets A.G., ed. *Generalized herpes infection: facts and the concept [Generalizovannaya gerpeticheskaya infektsiya: fakty i kontseptsiya]*. Minsk: Nauka i tekhnika; 1992. (in Russian)
2. Brune W. Inhibition of programmed cell death by cytomegaloviruses. *Virus Res.* 2011; 157(2): 144–50.
3. König A., Hömme C., Hauröder B. The varicella-zoster virus induces apoptosis *in vitro* in subpopulations of primary human peripheral blood mononuclear cells. *Microbes Infect.* 2003; 5 (10): 879–89.
4. Van de Berg P.J., Yong S.L., Remmerswaal E.B., van Lier R.A., ten Berge I.J. Cytomegalovirus-induced effector T cells cause endothelial cell damage. *Clin Vaccine Immunol.* 2012; 19 (5): 772–9.
5. Wang J.J., Li Y.F., Jin Y.Y., Wang X., Chen T.X. Effects of Epstein-Barr virus on the development of dendritic cells derived from cord blood monocytes: an essential role for apoptosis. *Braz. J. Infect. Dis.* 2012; 16 (1): 19–26.
6. Utkin O.V., Novikov V.V. Death receptors in the modulation of apoptosis. *Usp ekhi sovremennoy biologii*. 2012; 132 (4): 381–90. (in Russian)
7. Porquet N., Poirier A., Houle F., Pin A.L., Gout S., Tremblay P.L. et al. Survival advantages conferred to colon cancer cells by E-selectin-induced activation of the PI3K-NF κ B survival axis downstream of Death receptor-3. *BMC Cancer.* 2011; 11: 285.
8. Maniatis T., Fritch E., Sambrook Dzh. Synthesis and cloning of cDNA. In: Baev A.A., Skryabin K.G., ed. *Molecular cloning [Molekulyarnoe klonirovaniye]*. Moscow: Mir; 1984: 205–38. (in Russian)
9. Qin T. Upregulation of DR3 expression in CD4 T cells promotes secretion of IL-17 in experimental autoimmune uveitis. *Mol. Vis.* 2011; 17: 3486–93.
10. Twohig J.P., Marsden M., Cuff S. M., Ferdinand J.R., Gallimore A.M., Perks W.V. et al. The death receptor 3/TL1A pathway is essential for efficient development of antiviral CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T-cell immunity. *FASEB J.* 2012; 26 (8): 3575–86.

Received 22.06.13