

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ мРНК СПЛАЙСИРОВАННЫХ ВАРИАНТОВ DR3 В КРОВИ ПРИ ИНФЕКЦИОННОМ МОНОНУКЛЕОЗЕ

Цветкова В.Д.<sup>1</sup>, Сахарнов Н.А.<sup>1</sup>, Князев Д.И.<sup>1</sup>, Уткин О.В.<sup>1,2</sup>,  
Неумоина Н.В.<sup>1</sup>, Бруснигина Н.Ф.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии  
им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ,  
г. Нижний Новгород, Россия

**Резюме.** «Рецептор смерти» DR3 играет важную роль в инициации апоптоза, пролиферации или воспаления. Показано участие данного рецептора в различных заболеваниях, в том числе инфекционной природы. В результате альтернативного сплайсинга образуется множество вариантов мРНК DR3, кодирующих мембранные и растворимые формы рецептора с различными функциями. Особенности экспрессии, а также вклад отдельных вариантов DR3 в иммунопатогенез инфекционного мононуклеоза (ИМ) практически не изучены.

Целью настоящей работы явилась разработка, валидация и апробация способов оценки уровня экспрессии и встречаемости сплайсированных вариантов мРНК DR3 в крови с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) и ОТ-ПЦР при ИМ.

Разработанный вариант ОТ-ПЦР-РВ позволил специфично и чувствительно (лимит полуколичественной детекции = 34–35 циклов) определять относительное количество мРНК пула форм DR3, мембранных вариантов DR3 (LARD1a + LARD8), а также долю мРНК мембранных и растворимых форм рецептора у здоровых волонтеров и пациентов с острым инфекционным мононуклеозом (ОИМ). Показана низкая экспрессия в крови мРНК двух альтернативных мембранных вариантов DR3 – LARD1b и DR3beta, что позволяет отнести данные варианты к минорным формам. Обнаружено снижение относительного уровня экспрессии мРНК пула форм DR3 у пациентов с ОИМ по сравнению с условно здоровыми волонтерами на фоне отсутствия различий в экспрессии мРНК мембранных вариантов рецептора.

Для определения качественного вклада в экспрессию мембранных вариантов каждой из форм LARD1a и LARD8 был разработан двухраундовый «гнездовой» вариант ОТ-ПЦР. Показано, что в большинстве образцов здоровых волонтеров и пациентов с ОИМ в экспрессию мРНК мембранных вариантов DR3 вносят свой вклад как основная мембранная LARD1a, так и альтернативная LARD8 формы рецептора.

### Адрес для переписки:

Цветкова Вера Дмитриевна  
ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский  
институт эпидемиологии и микробиологии  
им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора  
603950, Россия, г. Нижний Новгород,  
ул. Малая Ямская, 71.  
Тел.: 8 (831) 469-79-46.  
E-mail: starikova@nniiem.ru

### Address for correspondence:

Cvetkova Vera D.  
I.N. Blokhina Research Institute of Epidemiology and  
Microbiology  
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod,  
Malaya Yamskaya str., 71.  
Phone: 7 (831) 469-79-46.  
E-mail: starikova@nniiem.ru

### Образец цитирования:

В.Д. Цветкова, Н.А. Сахарнов, Д.И. Князев,  
О.В. Уткин, Н.В. Неумоина, Н.Ф. Бруснигина,  
«Определение уровня экспрессии мРНК сплайсированных  
вариантов DR3 в крови при инфекционном  
мононуклеозе» // Медицинская иммунология, 2016.  
Т. 18, № 2. С. 139–150.  
doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-139-150

© Цветкова В.Д. и соавт., 2016

### For citation:

V.D. Cvetkova, N.A. Sakharov, D.I. Knyazev, O.V. Utkin,  
N.V. Neumoina, N.F. Brusnigina, "Determination of level  
expression of mRNA splicing variants for DR3 in blood cells in  
infectious mononucleosis",  
Medical Immunology (Russia) Meditsinskaya Immunologiya, 2016,  
Vol. 18, no. 2, pp. 139–150.  
doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-139-150

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-2-139-150>

Разработанные способы оценки уровня экспрессии и встречаемости мРНК DR3 позволяют комплексно охарактеризовать изменения в экспрессии и функционировании данного рецептора, вызванные ИМ. В рамках развития данной работы требуется дальнейшая апробация методики на выборках большего объема.

**Ключевые слова:** DR3/LARD, альтернативный сплайсинг, сплайсированные варианты, инфекционный мононуклеоз, ПЦР в реальном времени

## DETERMINATION OF LEVEL EXPRESSION OF mRNA SPLICING VARIANTS FOR DR3 IN BLOOD CELLS IN INFECTIOUS MONONUCLEOSIS

Cvetkova V.D.<sup>a</sup>, Sakharov N.A.<sup>a</sup>, Knyazev D.I.<sup>a</sup>, Utkin O.V.<sup>a,b</sup>,  
Neumoina N.V.<sup>a</sup>, Brusnigina N.F.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> I.N. Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

<sup>b</sup> Nizhny Novgorod State Medical Academy, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation

**Abstract.** The DR3 «death receptor» plays an important role in the initiation of apoptosis, proliferation, or inflammation. This receptor is shown to be involved in various diseases, including infectious conditions. Different variants of mRNA DR3 are formed as a result of alternative splicing. These variant transcripts encode membrane and soluble forms of the receptor which have different functions. Features of their expression and contribution of individual DR3 variants to the immune pathogenesis of infectious mononucleosis (IM) are poorly understood.

The purpose of this work was to develop, validate and test the techniques of DR3 gene expression assays, as well as to evaluate the DR3 mRNA splice variants by means of real-time RT-PCR and RT-PCR in the IM patients.

The original version of real-time RT-PCR allowed to determine relative amounts of DR3 mRNA, DR3 membrane variants (LARD1a + LARD8), and ratios of mRNAs encoding membrane and soluble forms of the receptor. The technique proved to be specific and sensitive (a semi-quantitative detection limit = 34–35 cycles) when tested in healthy volunteers and patients with acute infectious mononucleosis (AIM). Lower expression levels were shown for two alternative membrane variants of DR3 mRNA (LARD1b and DR3beta) thus regarding these isoforms as minor fractions. The relative levels of total DR3 mRNA expression were decreased in patients with AIM, as compared to healthy volunteers, whereas mRNA expression of membrane receptor variants did not differ between IM and controls.

To determine a qualitative contribution of either LARD1a and LARD8 variants into the expression of membrane forms of DR3, a two-step «nested» version of RT-PCR has been developed. It was shown that, in majority of control and IM samples, both main LARD1a, and alternative LARD8 membrane forms are contributing to mRNA expression of membrane DR3 variants.

The presented methods for evaluation of expression and occurrence of DR3 mRNA variants allow to characterize changes in the expression and function of this receptor associated with infectious mononucleosis. Further investigations are required to test the technique in larger number of samples.

**Keywords:** DR3/LARD, alternative splicing, mRNA variants, infectious mononucleosis, real-time PCR

## Введение

Трансмембранный белок второго типа DR3 (LARD) является одним из 8 членов семейства «рецепторов смерти», участвующих в инициации апоптоза, пролиферации или воспаления [12]. DR3 экспрессируется преимущественно в селезенке, тимусе и лейкоцитах периферической крови (Т- и В-лимфоцитах, NK- и NKT-клетках, макрофагах) [8]. Описана важная роль данного рецептора как в регуляции иммунных реакций,

так и в развитии воспалительных, аутоиммунных, онкологических и инфекционных заболеваний [5, 7, 9, 10].

В результате альтернативного сплайсинга образуется 14 вариантов мРНК DR3. Из них 4 мРНК кодируют мембранные формы рецептора, 8 мРНК соответствуют растворимым аналогам DR3, а 2 мРНК являются некодирующими [1, 11]. Функции мембранных и растворимых вариантов DR3 различны: мембранные формы ре-

цептора передают сигналы внутрь клеток, тогда как их растворимые аналоги препятствуют распространению сигнала [4]. Такой функциональный антагонизм различных сплайсированных вариантов DR3 играет важную роль в созревании и дальнейшей работе иммунокомпетентных клеток. Например, повышенная экспрессия некоторых растворимых вариантов в наивных Т-клетках защищает их от апоптоза, в то время как активированные Т-клетки экспрессируют полноразмерную мембранную форму DR3 – LARD1a, контролирующую пролиферацию лимфоцитов после активации [3].

Основными возбудителями инфекционного мононуклеоза (ИМ) и мононуклеоз-подобного синдрома являются вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) и цитомегаловирус (ЦМВ). Важной особенностью данных вирусов является способность модулировать апоптоз и пролиферацию иммунокомпетентных клеток [15, 16]. Рецептор DR3 является одним из ключевых элементов сигнального каскада, с участием которого осуществляется такая модуляция. Так, в работе Twohig и соавт. показано, что инфицирование ЦМВ приводит к повышению экспрессии DR3 CD8<sup>+</sup> цитотоксическими Т-лимфоцитами, что сопровождается усилением их пролиферации у мышей. При этом мыши, не экспрессирующие DR3, были более восприимчивы к ЦМВ-инфекции [14]. Вместе с тем особенности экспрессии и функциональной роли сплайсированных вариантов DR3 в иммунопатогенезе при ИМ ранее не исследовались. Одной из возможных причин является отсутствие методических подходов, позволяющих проводить дифференциальную детекцию отдельных вариантов мРНК DR3 и оценивать уровень их представленности.

**Целью настоящей работы** явилась разработка, валидация и апробация способов оценки уровня экспрессии, встречаемости сплайсированных вариантов мРНК DR3 в крови с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) и ОТ-ПЦР при ИМ.

## Материалы и методы

### Исследуемые образцы

Материалом послужила цельная периферическая кровь пациентов с диагнозом «острый инфекционный мононуклеоз» (ОИМ) (n = 20). Контрольную группу составляли условно здоровые волонтеры (n = 20), у которых отсутствовали клинические и лабораторные признаки данного заболевания.

### Экстракция нуклеиновых кислот

Выделение РНК/ДНК проводили с помощью набора МАГНО-сорб («ЦНИИЭ», Россия) на ро-

ботизированной станции выделения нуклеиновых кислот Xiril («Xiril», Швейцария). Каждый образец подвергали экстракции в 5 повторностях. Далее суммарную РНК отделяли от ДНК с помощью фенола (насыщенного ацетатом натрия, pH = 4,0) и хлороформа [6]. Полученную РНК концентрировали, переосаждая изопропанолом, ацетатом натрия (pH = 5,2) и гликогеном («Amresco», США) согласно рекомендации производителя. Осадок растворяли в 50 мкл воды I типа (Milli-Q) и хранили при -80 °C до использования. Концентрацию и чистоту выделенной суммарной РНК измеряли с помощью спектрофотометра BioPhotometer Plus («Eppendorf», Германия); чистота (A260/280) раствора РНК варьировала от 2,5 до 3.

### Дизайн праймеров и зондов

Используемые праймеры и зонды были сконструированы с помощью бесплатного программного продукта Primer-blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) (табл. 1). Расчетная температура плавления всех праймеров равнялась 60 °C, что обеспечивает возможность амплификации целевых и референсных молекул в одной пробирке и при одинаковых условиях. Зонды подбирали таким образом, чтобы их температура плавления была выше минимум на 10 °C. Все праймеры и зонды синтезированы компанией «ДНК-синтез» (Россия).

### Реакция обратной транскрипции

Для синтеза кДНК на матрице мРНК проводили реакцию обратной транскрипции с использованием амплификатора MaxyGene Gradient («Axygen», США) и набора RevertAid Reverse Transcriptase («Thermo Scientific», США) согласно рекомендации производителя. Для дальнейшей постановки ПЦР в реальном времени использовали 9 аналогичных реакций ОТ с применением смеси праймеров DR3R8 и FPGSR, а для постановки двухраундовой ПЦР в реакцию ОТ добавляли праймер DR3TMR4 в концентрациях, указанных в таблице 1. В качестве матрицы использовали тотальную очищенную РНК (см. раздел «Экстракция нуклеиновых кислот») в количестве 5 мкг. Постановку контрольной реакции по-RT (обратная транскрипция без фермента обратной транскриптазы) выполняли аналогичным способом, но вместо обратной транскриптазы добавляли воду I типа (Milli-Q). Синтезированную кДНК очищали от компонентов ОТ-буфера, высаживая изопропанолом в присутствии гликогена («Amresco», США). Осадок растворяли в 45 и 100 мкл воды I типа (для постановки реакции ПЦР-РВ и двухраундовой ПЦР соответственно).

### Постановка ПЦР в реальном времени

Определение относительного уровня экспрессии мРНК пула мембранных и растворимых

ТАБЛИЦА 1. ПРАЙМЕРЫ И TaqMan зонды для ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Назначение	Целевой ген	Название	Последовательность (5'–3')	Концентрация	Позиция	Размер ампликона (н.о.)
ОТ-ПЦР в реальном времени						
ОТ	DR3	DR3R8	CGCAGCAGCGGGGCCAAGA	1000 нМ	1009-1027 <sup>1</sup> ; 874-892 <sup>2</sup> ; 924-942 <sup>3</sup> ; 1036-1054 <sup>4</sup>	-
	FPGS	FPGSR	ACCACAGGCTTCCTGATGATG	1000 нМ	683-703 <sup>5</sup>	-
ПЦР-РВ (мРНК пула форм DR3)	DR3	DR3F9ex	CCGTCCAGTTGGTGGGTAAC	400 нМ	906-925 <sup>1</sup>	119
		DR3R9	AGCAGCGGGGCCAAGA	160 нМ	1009-1024 <sup>1</sup>	
		DR3PuIRZ	FAM-CTCTGCCCCGACGGTGACATGGTCTCTG-BHQ-1	200 нМ	962-987 <sup>1</sup>	
ПЦР-РВ (мРНК LARD1a+ LARD8)	DR3	DR3F6/7ex	CTGGAGGCAGATGTTCTGG	400 нМ	676-694 <sup>1</sup> ; 541-559 <sup>2</sup>	133
		DR3RM1	CCCAGCTTCATCTGCAGTAAC	200 нМ	788-808 <sup>1</sup> ; 653-673 <sup>2</sup>	
		DR3MgeneralZ	FAM-CAGCAGTGGCGGTATGTGTAGGTCA-BHQ-1	200 нМ	747-771 <sup>1</sup> ; 612-636 <sup>2</sup>	
ПЦР-РВ (мРНК LARD1b)	DR3	DR3F6/7ex	CTGGAGGCAGATGTTCTGG	400 нМ	588-606 <sup>3</sup>	133
		DR3RM2	AGCTTCATCTGCTGCAGTAAC	400 нМ	700-720 <sup>3</sup>	
		DR3MgeneralZ	FAM-CAGCAGTGGCGGTATGTGTAGGTCA-BHQ-1	200 нМ	659-683 <sup>3</sup>	

Таблица 1 (окончание)

Назначение	Целевой ген	Название	Последовательность (5'–3')	Концентрация	Позиция	Размер ампликона (н.о.)
ПЦР-PB (мРНК DR3β)	DR3	DR3Fbeta	GGAGGCAGAGTAGGTGTGTTCC	400 нМ	698-718 <sup>4</sup>	138
		DR3RM1	CCCAGCTTCATCTGCAGTAAC	400 нМ	815-835 <sup>4</sup>	
		DR3MgeneralZ	FAM-CAGCAGTGGCGGTATGTGTAGGTCA-BHQ-1	200 нМ	774-798 <sup>4</sup>	
ПЦР-PB (мРНК FPGS)	FPGS	FPGSF	ATGGCCTGAAGACGGGATTTC	200 нМ	412-431 <sup>5</sup>	154
		FPGSR2	ACACAGCTGCCATCC TTGGT	200 нМ	546-565 <sup>5</sup>	
		FPGSZ	ROX-CAgTCCTgAgCTCTTTCACCAAgTACTT-BHQ-2	100 нМ	491-517 <sup>5</sup>	
ОТ-ПЦР						
ОТ	DR3	DR3TMR4	CCCAGCTTCATCTGCAGTAA	2000 нМ	789-808 <sup>1</sup> 654-673 <sup>2</sup>	-
I раунд ПЦР	DR3	DR3F0	GTGACTTCCACAAGAAGATT	400 нМ	198-217 <sup>1,2</sup>	611 – для LARD1a; 614 – для LARD8
		DR3TMR4	CCCAGCTTCATCTGCAGTAA	400 нМ	789-808 <sup>1</sup> 654-673 <sup>2</sup>	
II раунд ПЦР (мРНК LARD1a)	DR3	DR3FLARD1A	TGATGAGCAGGGCCTCCCCAG	400 нМ	373-391 <sup>1</sup>	328
		DR3R10	CTGGACCCAGAACATCTGCC	400 нМ	681-700 <sup>1</sup>	
II раунд ПЦР (мРНК LARD8)	DR3	DR3FLARD8	CCCAGCGGCCTCCCA	400 нМ	241-255 <sup>2</sup>	325
		DR3R10	CTGGACCCAGAACATCTGCC	400 нМ	546-565 <sup>2</sup>	

**Примечание.** 1 – позиция в последовательности NCBI с номером NM\_003790.2; соответствует основной полноразмерной форме мРНК DR3 – LARD1a.  
2 – позиция в последовательности NCBI с номером NM\_148967.1; соответствует альтернативной мембранной форме мРНК DR3 – LARD8.  
3 – позиция в последовательности NCBI с номером U94502.1; соответствует альтернативной мембранной форме мРНК DR3 – LARD1b.  
4 – позиция в последовательности NCBI с номером NM\_148965.1; соответствует альтернативной мембранной форме мРНК DR3 – DR3β.  
5 – позиция в последовательности NCBI с номером NM\_004957.5; соответствует основной полноразмерной форме мРНК FPGS – изоформа 1.

вариантов DR3, мРНК мембранных вариантов LARD1a + LARD8, LARD1b, DR3beta осуществляли с помощью мультиплексной реакции ПЦР-РВ в отдельных пробирках. В качестве нормализатора использовали ген FPGS, обладающий стабильной экспрессией в клетках периферической крови [13]. В состав реакционной смеси объемом 25 мкл входили следующие компоненты: 5-кратный ПЦР-буфер blue 15 mM Mg<sup>2+</sup>; 2,5 е.а. Taq-F ДНК-полимераза («ЦНИИЭ», Россия); смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (до конечной концентрации 0,16 mM) («Силекс», Россия); праймеры и зонды в оптимизированных концентрациях, указанных в таблице 1; Hi-Di формамид (2% по объему) («Applied Biosystems», США) и 2 мкл целевой кДНК (около 2 мкг). Используемая оптимальная концентрация Hi-Di формамида позволяла повысить специфичность и выход ПЦР-продукта с богатым GC-составом без эффекта ингибирования реакции. Амплификацию специфичных фрагментов и детекцию результатов проводили на амплификаторе Rotor-Gene Q 5plex HRM («Qiagen», Германия). Температурный профиль ПЦР-реакции содержал стадию инициации денатурации и активации полимеразы на 94 °C в течение 15 мин, с последующим проведением 50 циклов (денатурация при 94 °C — 25 с; отжиг праймеров при 58 °C — 30 с; элонгация при 72 °C — 30 с). Детекцию уровней флуоресценции проводили в конце стадии отжига праймеров (58 °C-сегмент) по каналам FAM и ROX. Продукты ПЦР-РВ также были проанализированы с помощью электрофореза в 2% агарозном геле, содержащем бромид этидия (0,02% по объему).

#### Валидация ПЦР в реальном времени

Первоначально нами была проведена ПЦР-реакция целевых и референсного генов в отдельных пробирках. Для определения порогового цикла (Ct) каждой ПЦР-реакции устанавливали значение пороговой линии (на уровне начала линейного участка экспоненциальной фазы амплификации). Подбирали минимальную концентрацию праймеров, при которой наблюдалось низкое значение Ct, высокий уровень флуоресценции и наименьшее количество неспецифических продуктов по результатам электрофореза для каждой молекулы-мишени. Затем мы осуществляли одновременную амплификацию целевого и референсного генов в дуплексной реакции ПЦР и анализировали изменение Ct. По результатам были скорректированы концентрации праймеров таким образом, что значения Ct в мультиплексной реакции не отличались от аналогичных значений одиночных ПЦР-реакций.

Чтобы определить лимит полуколичественной детекции (ЛПКД) (граничное значение Ct, при

котором можно провести полуколичественную оценку экспрессии гена), мы построили стандартную кривую для каждой целевой молекулы, включающую в себя не менее 7-9 выборочных двукратных разведений концентрированной матрицы. Разведения были подобраны таким образом, чтобы значения их Ct выходили за рамки самого низкого уровня ожидаемой концентрации мишени в тестируемых образцах. Для каждой целевой молекулы было отобрано максимальное значение Ct, для которого не происходило значительного разброса значений в триplete (не более 0,5 цикла), и принимали его за ЛПКД.

Каждая ПЦР-постановка включала в себя триплеты тестируемых образцов и их разведений (4-кратных для пула форм DR3 (1); 2-кратных для мРНК мембранных вариантов LARD1a + LARD8 (2)), а также отрицательный контроль. Результаты ПЦР-реакции считали достоверными, если разброс значений Ct в триplete составлял не более 0,5 цикла. Полученные средние значения Ct использовали для построения стандартной кривой. Эффективность ПЦР-реакции определяли по формуле:  $E = 10^{-1/\text{slope}}$ , где slope — тангенс угла наклона стандартной кривой.

#### Двухраундовая «гнездовая» ПЦР

Для раздельной качественной детекции мРНК LARD1a и LARD8 использовали двухраундовый «гнездовой» вариант ПЦР. Реакционная смесь (25 мкл) первого раунда ПЦР содержала 5-кратный ПЦР-буфер blue 15 mM Mg<sup>2+</sup>; 2,5 е.а. Taq-F ДНК-полимераза («ЦНИИЭ», Россия); смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (до конечной концентрации 0,16 mM) («Силекс», Россия); прямой DR3F0 и обратный DR3TMR4 праймеры в концентрациях, указанных в таблице 1. В качестве матрицы использовалась очищенная целевая кДНК, в объеме 2 мкл на реакцию (около 0,1 мкг). Готовую реакционную смесь инкубировали 15 мин при 94 °C, проводили 30 циклов (94 °C — 30 с; 55 °C — 30 с; 72 °C — 40 с) амплификации и цикл достройки цепей 72 °C — 5 мин. Второй раунд ПЦР проводили в разных пробирках с использованием специфических пар праймеров для LARD1a или LARD8 (табл. 1). Помимо праймеров, в состав реакционной смеси также входили 5-кратный ПЦР-буфер, Taq-F ДНК-полимераза, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, Hi-Di формамид (3% по объему) и 2 мкл продукта первого раунда ПЦР. Температурный профиль реакции включал в себя денатурацию при 94 °C — 15 мин, 25 циклов амплификации (94 °C — 25 с; 63,5 °C — 30 с; 72 °C — 30 с) с последующей инкубацией при 72 °C — 5 мин. Визуализацию результатов двух раундов ПЦР проводили с помощью электрофореза в 2% агарозном геле,

содержащем бромид этидия (0,02% по объему). Результаты детектировали на трансиллюминаторе InGenius 3 с использованием программного продукта GeneSys («Syngene», Великобритания).

#### Секвенирование продуктов ПЦР-реакции

Определение нуклеотидной последовательности продуктов ПЦР-РВ и двухраундовой «гнездовой» ПЦР проводили на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 («Applied Biosystems», США). Для этого вырезанные из 3% агарозного геля фрагменты кДНК очищали с помощью набора PureLink Quick Gel Extraction Kit («Invitrogen», США) и проводили реакцию терминирования с использованием набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США) согласно рекомендации производителя. Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями мРНК мембранных форм DR3 (NM\_003790.2; NM\_148967.1; U94502.1; NM\_148965.1) и мРНК основной полноразмерной формы референсного гена FPGS (NM\_004957.5), зарегистрированных в базе данных NCBI GenBank.

#### Обработка результатов

Относительное количество молекул-мишеней в каждой пробе рассчитывали по формуле:  $\text{relative amount} = E_{\text{ref}}^{C_t} / E_{\text{targ}}^{C_t}$ , где ref — ген-референт FPGS, targ — исследуемый ген DR3. Статистическую обработку результатов проводили с использованием статистических пакетов Microsoft Excel 2007 и Statistica 8.0. При сравнении двух групп в зависимости от типа данных применяли критерий Манна–Уитни или двусторонний тест точного критерия Фишера. Результаты по относительным уровням экспрессии мРНК пула форм и мембранных вариантов LARD1a + LARD8 указаны в виде медианы (Me) с интерквартильным размахом 25–75-й процентиля (Q25–Q75); данные по встречаемости мРНК отдельных вариантов LARD1b, DR3beta, LARD1a, LARD8 представлены в виде относительных частот. Статистически значимыми считали различия между группами при  $p < 0,05$ . Долю мРНК мембранных вариантов DR3 рассчитывали по формуле:  $\text{Me (LARD1a + LARD8)} / \text{Me (пул форм DR3)}$ ; для определения доли мРНК растворимых вариантов рецептора из единицы вычитали долю мРНК мембранных вариантов LARD1a + LARD8, где Me — медиана.

## Результаты

#### Стратегия подбора праймеров

Рецептор DR3 характеризуется высокой гетерогенностью нуклеотидных последовательностей мРНК сплайсированных вариантов, что определяет трудности в подборе общих участков для по-

садки праймеров. Например, последовательность 7 экзона, кодирующая трансмембранный домен DR3, не является специфичной для мРНК мембранных форм. В связи с этим нами предложена следующая схема расположения пар праймеров в реакциях ОТ-ПЦР-РВ (рис. 1):

(1) Прямой DR3F9ex и обратный DR3R9 праймеры. Позволяют амплифицировать участок 9 экзона, общего для всех кодирующих форм мРНК DR3, и, таким образом, выявлять пул форм мРНК данного рецептора.

(2) Прямой DR3F6/7ex и обратный DR3RM1 праймеры. Позволяют детектировать мРНК двух мембранных вариантов: полноразмерного LARD1a и альтернативного LARD8.

(3) Прямой DR3F6/7ex и обратный DR3RM2 праймеры. С их помощью происходит наработка фрагмента, соответствующего альтернативному мембранному варианту LARD1b.

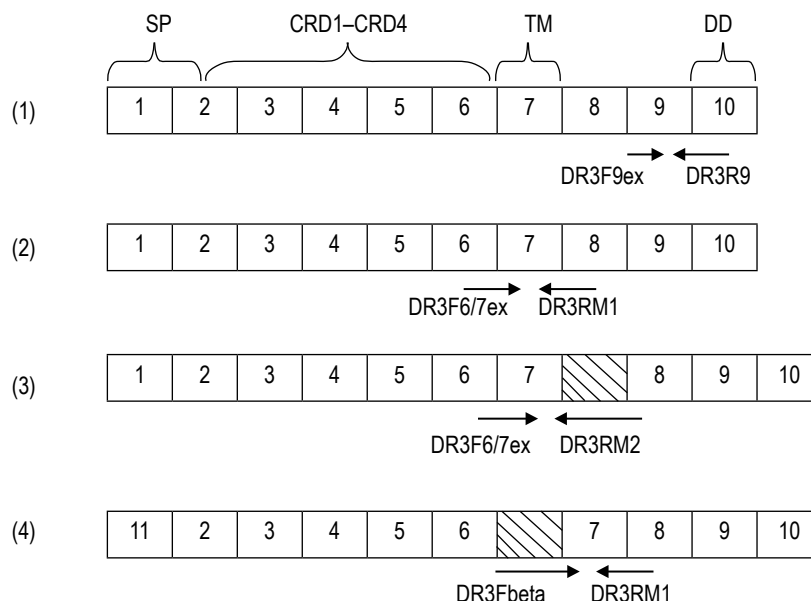
(4) Прямой DR3Fbeta и обратный DR3RM1 праймеры. Фланкируют фрагмент, специфичный для мРНК альтернативного мембранного варианта DR3beta.

#### Валидация ПЦР в реальном времени

Валидацию и оптимизацию реакций ОТ-ПЦР-РВ проводили в несколько этапов. Чтобы избежать амплификации фрагментов ДНК, праймеры располагали преимущественно на стыках «экзон–экзон». Отсутствие наработки геномной ДНК подтвердили, проводя контрольные реакции по-RT. С помощью свенирования нами была доказана специфичность амплифицируемых в реакциях ОТ-ПЦР-РВ и ОТ-ПЦР фрагментов.

Оптимальные значения пороговой линии были установлены на уровне 0,02 для ПЦР-реакций целевого гена DR3/LARD и 0,015 — для гена-нормализатора FPGS. По результатам экспериментальных триплетных постановок реакций ОТ-ПЦР-РВ (результаты не представлены) концентрации праймеров были скорректированы до следующих значений (табл. 1): 400 нМ DR3F9ex и 160 нМ DR3R9; 400 нМ DR3F6/7ex и 200 нМ DR3RM1; 400 нМ DR3F6/7ex и 400 нМ DR3RM2; 400 нМ DR3Fbeta и 400 нМ DR3RM1. Для амплификации гена FPGS в каждой дуплексной ПЦР-реакции использовали прямой FPGSF и обратный FPGSR2 праймеры в концентрациях по 200 нМ. В состав реакционной смеси также включали Hi-Di формамид в оптимальной концентрации (2% от объема ПЦР-смеси), повышающей специфичность и выход ПЦР-продукта без эффекта ингибирования реакции.

Для каждой целевой молекулы определяли лимит полуколичественной детекции (ЛПКД), отражающий предельную чувствительность полуколичественного определения экспрессии мРНК DR3 (рис. 2). В результате для мРНК



**Рисунок 1. Схема расположения пар праймеров в реакциях ОТ-ПЦР-РВ**

**Примечание.** SP – участок мРНК, кодирующий сигнальный пептид; CRD1-CRD4 – участок мРНК, кодирующий цистеин-обогащенные домены; TM – участок мРНК, кодирующий трансмембранный домен; DD – участок мРНК, кодирующий домен смерти.

Прямоугольниками с цифрами схематично изображены экзоны; заштрихованными прямоугольниками показаны нуклеотидные вставки в альтернативных сплайсированных вариантах мРНК; стрелками обозначены места посадки праймеров.

пула изоформ DR3 (при эффективности реакции 1,99) ЛПКД был равен 34,77 циклам (рис. 2А); аналогичное значение для мРНК мембранных вариантов LARD1a + LARD8(2) (при эффективности реакции 1,87) было равным 34,81 циклам (рис. 2Б). Таким образом, при *St* исследуемых мишеней меньше данных значений ЛПКД проводилась полуколичественная оценка экспрессии, тогда как при большем значении *St* делались выводы только о качественной детекции целевой молекулы. Показатели *St* мембранных вариантов LARD1b (3) и DR3beta (4), полученные на неразведенной концентрированной матрице, были ниже 35 циклов, поэтому для данных вариантов возможна только качественная оценка экспрессии мРНК.

#### **Построение стандартной кривой и определение эффективности реакции**

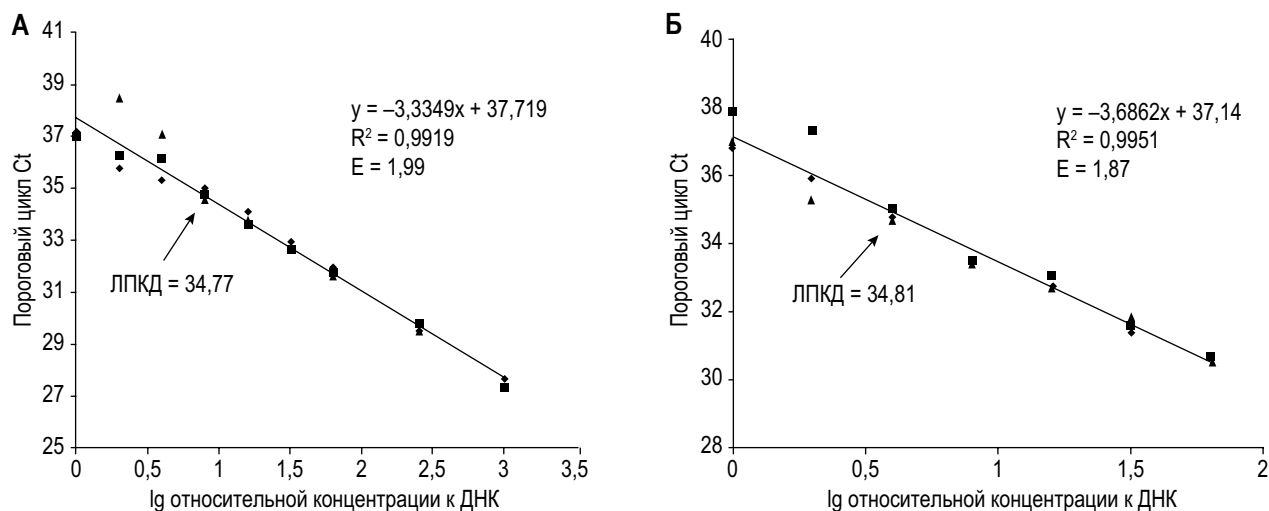
Для определения относительного уровня экспрессии мРНК пула форм DR3 (1) и мембранных форм LARD1a + LARD8 (2) осуществляли построение стандартной кривой с дальнейшим определением эффективности реакции (рис. 3). Использование различных (4- и 2-кратных) разведений для мишеней с высокой и низкой концентрацией позволяло сделать выводы о линейности диапазона амплификации в максимально широких рамках, но при этом не выходящих за ЛКД. Стандартные кривые исследуемых образцов показали значения коэффициента кор-

реляции  $R^2$  не менее 0,985. Эффективность реакции как для мРНК пула форм DR3 (1), так и для мРНК некоторых мембранных вариантов (2) варьировала в пределах 1,75–2,05 от образца к образцу; в связи с этим мы осуществляли построение стандартной кривой и определение эффективности реакции для каждой тестируемой матрицы.

#### **Анализ уровней экспрессии мРНК DR3 в образцах пациентов с ОИМ**

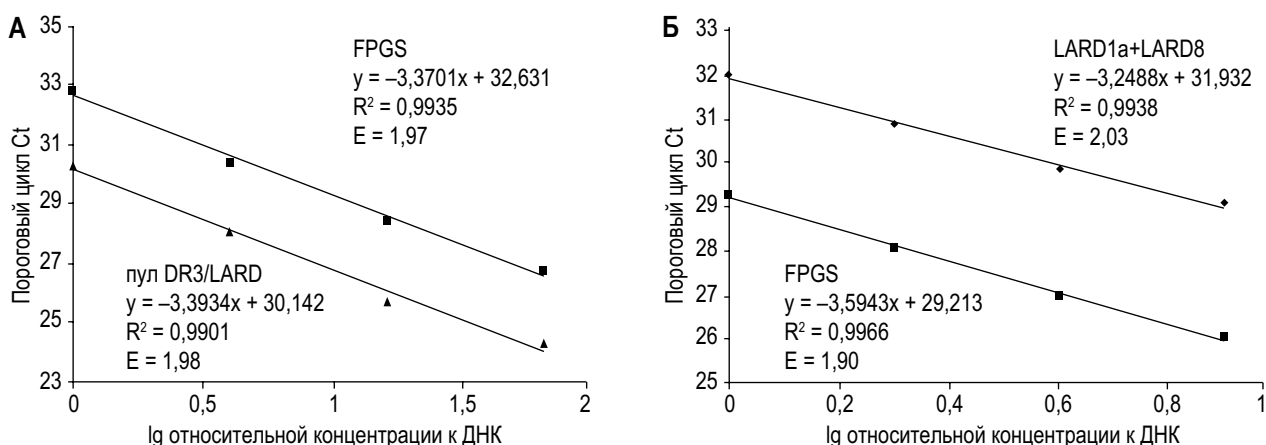
Результаты исследования экспрессии мРНК DR3 и встречаемости отдельных форм мРНК рецептора с помощью разработанных вариантов методов ОТ-ПЦР-РВ и ОТ-ПЦР приведены в таблице 2. Так как низкая экспрессия мРНК мембранных вариантов LARD1b и DR3beta позволила провести только качественную оценку данных параметров, за относительную экспрессию мРНК суммарного пула мембранных вариантов приняли уровень представленности мембранных вариантов мРНК LARD1a + LARD8. Нами было обнаружено снижение относительного уровня экспрессии мРНК пула форм DR3 у пациентов с ОИМ в 2,4 раза по сравнению с условно здоровыми волонтерами ( $p = 0,004$ ) на фоне неизменной экспрессии мембранных вариантов рецептора. При этом изменяется соотношение экспрессии мембранных/растворимых вариантов DR3: доля мРНК мембранных вариантов рецептора у пациентов с ОИМ значительно повы-





**Рисунок 2. Стандартные кривые для определения лимита полуколичественной детекции (ЛПКД) мРНК пула изоформ DR3 (А) и мембранных вариантов LARD1a + LARD8 (Б)**

**Примечание.** Значения лимита полуколичественной детекции (ЛПКД), эффективности (Е) и коэффициента детерминации ( $R^2$ ) указаны на графике. Данные представлены в виде триплетных значений Ct для каждого разведения кДНК.



**Рисунок 3. Построение стандартных кривых на основе 4-кратных разведений кДНК для пула изоформ DR3 (А) и 2-кратных разведений кДНК для мембранных вариантов LARD1a + LARD8 (Б) на примере одного из исследуемых образцов**

**Примечание.** Исследуемые мишени представлены в виде: треугольник – пул DR3; ромб – LARD1a + LARD8; квадрат – FPGS. Значения эффективности (Е) и коэффициента детерминации ( $R^2$ ) указаны на графике. Все точки представляют собой среднее значение Ct триплетной/дуплетной ПЦР-постановки каждого разведения.

шена (0,13 против 0,04; в 3,3 раза), тогда как доля мРНК растворимых вариантов несколько снижалась (0,87 против 0,96; в 1,1 раза).

При исследовании встречаемости мРНК отдельных мембранных вариантов в крови здоровых волонтеров и пациентов с ОИМ в рамках данных выборок нами не было обнаружено статистически значимых изменений (табл. 2).

## Обсуждение

По сравнению с рецепторами смерти FAS/CD95 и TNFR1 свойства и функции DR3/LARD изучены мало. Ограниченная преимуществен-

но лимфоидной тканью экспрессия данного рецептора предполагает возможную роль DR3 в регуляции иммунного ответа при различных заболеваниях, в том числе инфекционной природы. Так, была показана протективная роль DR3 при инфицировании мышей *Salmonella enterica Typhimurium*; активация рецептора способствовала усиленной продукции интерферонов Т-лимфоцитами и приводила к эффективному освобождению организма от бактерии [5]. У мышей с ЦМВ-инфекцией была обнаружена повышенная экспрессия DR3 CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитами, что также способствовало элиминации вируса

ТАБЛИЦА 2. ВСТРЕЧАЕМОСТЬ И ОТНОСИТЕЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ мРНК DR3 В КРОВИ УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ВОЛОНТЕРОВ И ПАЦИЕНТОВ С ОИМ

Исследуемые группы	Относительный уровень экспрессии мРНК; Me (Q25-Q75)		Доля мРНК мембранных вариантов (LARD1a + LARD8)	Доля мРНК растворимых вариантов	Встречаемость мРНК			
	Пул форм DR3	мембранные варианты LARD1a + LARD8			мембранный вариант LARD1b	мембранный вариант DR3 beta	мембранный вариант LARD1a	мембранный вариант LARD8
Условно здоровые волонтеры, n = 20	11,30 (10,80-20,60)	0,45 (0,08-0,80)	0,04	0,96	20/20	18/20	20/20	16/20
Пациенты с ОИМ, n = 20	4,66 (2,00-6,07)*	0,59 (0,11-0,80)	0,13	0,87	20/20	14/20	20/20	20/20

Примечание. \* – p < 0,05 по сравнению с условно здоровыми волонтерами.

из организма [14]. В свою очередь, нами было проведено предварительное исследование, направленное на изучение встречаемости мРНК некоторых альтернативных вариантов рецептора DR3 при герпесвирусной инфекции различной этиологии. При инфицировании вирусом ветряной оспы было обнаружено снижение встречаемости мРНК растворимого варианта DR3 soluble beta, ингибирующего передачу активационных сигналов, что может рассматриваться как один из путей ухода вируса от иммунологического контроля [2]. Таким образом, имеющиеся данные об участии рецептора DR3 в регуляции иммунного ответа при инфекционных заболеваниях чаще всего не учитывают функциональную гетерогенность различных (мембранных и растворимых) изоформ DR3.

Задача, решаемая в настоящей работе, заключалась в разработке и апробации способа определения уровня экспрессии и встречаемости сплайсированных вариантов мРНК DR3 в крови с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) и ОТ-ПЦР при ИМ. Разработанный вариант ОТ-ПЦР-РВ позволил специфично и чувствительно (ЛПКД = 34-35 циклов) определять относительное количество мРНК пула кодирующих форм DR3 и мембранных вариантов LARD1a + LARD8. Впервые показана экспрессия в крови мРНК двух альтернативных мембранных вариантов DR3 – LARD1b и DR3beta. Тем не менее, в силу низкой экспрессии данные альтернативные варианты, по всей видимости, относятся к минорным формам и их вклад в экспрессию пула мРНК мембранных вариантов DR3 является незначительным. Таким образом, с помощью ОТ-ПЦР-РВ мы определяли относительное количество мРНК пула форм DR3, мембранных вариантов DR3 (LARD1a + LARD8), а также долю мРНК мембранных и растворимых форм рецептора у здоровых волонтеров и пациентов с ОИМ. Обнаруженное снижение экспрессии мРНК пула кодирующих форм DR3 у пациентов с ОИМ предположительно происходило за счет падения экспрессии растворимых вариантов мРНК, что подтверждалось снижением доли мРНК растворимых форм рецептора. При этом закономерно возрастала доля мРНК мембранных вариантов DR3, указывающая на возможный рост функциональной роли этих вариантов рецептора при ОИМ.

Для определения качественного вклада в экспрессию мембранных вариантов LARD1a + LARD8 каждой из форм мы разработали двухраундовый гнездовой вариант ОТ-ПЦР. В результате обнаружено, что в большинстве об-

разцов здоровых волонтеров и пациентов с ОИМ в экспрессию мРНК мембранных вариантов DR3 вносят свой вклад как основная мембранная LARD1a, так и альтернативная LARD8 формы рецептора. Отсутствие различий во встречаемости отдельных мембранных вариантов LARD1b, DR3beta, LARD1a и LARD8 между здоровыми волонтерами и пациентами с ОИМ может объясняться как малым объемом выборок, так и отсутствием изменений профиля продуктов альтернативного сплайсинга.

Таким образом, разработанные способы качественной и полуколичественной оценки экспрессии сплайсированных вариантов мРНК DR3 могут быть применены:

а) для оценки вклада отдельных изоформ DR3 и их групп в реализацию функций данного рецептора;

б) при изучении функциональных взаимосвязей DR3 с другими поверхностными рецепторами и элементами внутриклеточных сигнальных путей в различных типах клеток при широком спектре заболеваний.

В рамках развития данной пилотной работы нами планируется увеличить объем исследуемых выборок здоровых волонтеров и пациентов с ОИМ, а также оценить экспрессию мРНК DR3 в зависимости от этиологии, тяжести течения заболевания и других клинических и лабораторных показателей.

## Список литературы / References

1. Уткин О.В., Новиков В.В. Рецепторы смерти в модуляции апоптоза // Успехи современной биологии, 2012. Т. 132, №4. С. 381-390. [Utkin O.V., Novikov V.V. Death receptors in modulation of apoptosis. *Uspekhi sovremennoy biologii = Biology Bulletin Reviews*, 2012, Vol. 132, no. 4, pp. 381-390. (In Russ.)]
2. Уткин О.В., Старикова В.Д., Новиков В.В. Встречаемость сплайсированных вариантов матричной РНК DR3/LARD при герпесвирусной инфекции // Вопросы вирусологии, 2014. Т. 59, № 6. С. 36-38. [Utkin O.V., Starikova V.D., Novikov V.V. Frequency of occurrence spliced variants of messenger RNA DR3/LARD at herpesviral infection. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2014, Vol. 59, no. 6, pp. 36-38. (In Russ.)]
3. Bamias G., Mishina M., Nyce M., Ross W.G., Kollias G., Rivera-Nieves J., Pizarro T.T., Cominelli F. Role of TL1A and its receptor DR3 in two models of chronic murine ileitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, Vol. 103, no. 22, pp. 8441-8446.
4. Borysenko C.W., A-Palacios V.N.G., Griswold R.D., Li Y., Iyer A.K., Yaroslavskiy B.B., Sharrow A.C., Blair H.C. Death Receptor-3 Mediates Apoptosis in Human Osteoblasts Under Narrowly Regulated Conditions. *J. Cell. Physiol.*, 2006, Vol. 209, no. 3, pp. 1021-1028.
5. Buchan S.L., Taraban V.Y., Slebioda T.J., James S., Cunningham A.F., Al-Shamkhani A. Death receptor 3 is essential for generating optimal protective CD4<sup>+</sup> T-cell immunity against Salmonella. *Eur. J. Immunol.*, 2012, Vol. 42, no. 3, pp. 580-588.
6. Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.*, 2006, Vol. 1, no. 2, pp. 581-585.
7. Meylan F., Richard A.C., Siegel R.M. TL1A and DR3, a TNF family ligand-receptor pair that promotes lymphocyte costimulation, mucosal hyperplasia, and autoimmune inflammation. *Immunol. Rev.*, 2011, Vol. 244, no. 1, pp. 188-196.
8. Pappu B.P., Borodovsky A., Zheng T.S., Yang X., Wu P., Dong X., Weng S., Browning B., Scott M.L., Ma L., Su L., Tian Q., Schneider P., Flavell R.A., Dong C., Burkly L.C. TL1A-DR3 interaction regulates Th17 cell function and Th17-mediated autoimmune disease. *J. Exp. Med.*, 2008, Vol. 205, no. 5, pp. 1049-1062.
9. Porquet N., Poirier A., Houle F., Pin A-L., Gout S., Tremblay P-L., Paquet E.R., Klinck R., Auger F.A., Huot J. Survival advantages conferred to colon cancer cells by E-selectin-induced activation of the PI3K-NFκB survival axis downstream of Death receptor-3. *BMC Cancer*, 2011, Vol. 11, p. 285.
10. Qin T. Upregulation of DR3 expression in CD4<sup>+</sup> T cells promotes secretion of IL-17 in experimental autoimmune uveitis. *Mol. Vis.*, 2011, Vol. 17, pp. 3486-3493.
11. Screaton G.R., Xu X.N., Olsen A.L., Cowper A.E., Tan R., McMichael A.J. et al. LARD: A new lymphoid-specific death domain containing receptor regulated by alternative pre-mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, Vol. 94, no. 9, pp. 4615-4619.
12. Sessler T., Healy S., Samali A., Szegezdi E. Structural determinants of DISC function: new insights into death receptor-mediated apoptosis signalling. *Pharmacol. Ther.*, 2013, Vol. 140, pp. 186-199.
13. Stamova B.S., Apperson M., Walker W.L., Tian Y., Xu H., Adamczyk P., Zhan X., Liu D.Z., Ander B.P., Liao I.H., Gregg J.P., Turner R.J., Jickling G., Lit L., Sharp F.R. Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies in human peripheral blood. *BMC Medical Genomics*, 2009, Vol. 2, p. 49.
14. Twohig J.P., Marsden M., Cuff S.M., Ferdinand J.R., Gallimore A.M., Perks W.V., Al-Shamkhani A., Humphreys I.R., Wang E.C. The death receptor 3/TL1A pathway is essential for efficient development of antiviral CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell immunity. *FASEB J.*, 2012, Vol. 26, no. 8, pp. 3575-3586.

15. 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, Vol. 19, no. 5, pp. 772-779.
16. 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, Vol. 16, no. 1, pp. 19-26.

---

**Авторы:**

**Цветкова В.Д.** — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

**Сахарнов Н.А.** — научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

**Князев Д.И.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

**Уткин О.В.** — к.б.н., заведующий лабораторией молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора; ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Нижний Новгород, Россия

**Неумоина Н.В.** — к.м.н., главный врач клиники инфекционных болезней ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

**Бруснигина Н.Ф.** — к.м.н., доцент, заведующий лабораторией метагеномики и молекулярной индикации патогенов ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

---

**Authors:**

**Cvetkova V.D.**, Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, I.N. Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

**Sakharnov N.A.**, Research Associate, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, I.N. Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

**Knyazev D.I.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, I.N. Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

**Utkin O.V.**, PhD (Biology), Head, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, I.N. Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Nizhny Novgorod State Medical Academy, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation

**Neumoina N.V.**, PhD (Medicine), Medical Director, Clinics of Infectious Diseases, I.N. Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

**Brusnigina N.F.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Head, Laboratory of Metagenomics and Molecular Detection of Pathogens, I.N. Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation