

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ мРНК ОСНОВНЫХ УЧАСТНИКОВ СИГНАЛИНГА АПОПТОЗА И ВЫЖИВАНИЯ В ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ВЭБ-ИНФЕКЦИОННЫМ МОНОНУКЛЕОЗОМ

Н.А. Сахарнов, О.В. Уткин, Е.Н. Филатова, Д.И. Князев, Н.Б. Преснякова

ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия

Резюме. Острый ВЭБ-ассоциированный мононуклеоз развивается преимущественно у детей и у пациентов с функциональными нарушениями иммунитета. Последствием перенесенной инфекции могут быть развитие вторичной иммунной недостаточности, новообразований, различные нарушения клеточных иммунных реакций. Несмотря на активное изучение молекулярных механизмов ВЭБ-инфекции, необходим поиск новых молекулярно-генетических факторов патогенеза ВЭБ-опосредованного мононуклеоза и ВЭБ-ассоциированной злокачественной трансформации клеток, которые могут быть использованы в клинической практике для мониторинга течения инфекции и в качестве предиктивных показателей риска развития ВЭБ-ассоциированных осложнений в виде иммунодефицита и новообразований. В настоящей работе был проведен комплексный полуквантитативный анализ экспрессии мРНК основных участников сигналинга апоптоза и выживания в лейкоцитах крови детей с острым ВЭБ-инфекционным мононуклеозом и в период реконвалесценции с помощью разработанных нами сплайсинг-ориентированных ДНК-микрочипов. Такие микрочипы позволяли оценивать как суммарную экспрессию генов (маркированных знаком — Σ), так и отдельных транскриптов, образующихся в результате альтернативного сплайсинга. Показано, что баланс уровней мРНК в острой фазе ВЭБ-инфекционного мононуклеоза смещался в сторону повышения экспрессии антиапоптотических факторов и элементов NF- κ B-зависимого сигналинга выживания, что может существенно усиливать резистентность клеток к апоптозу. Литературными данными подтверждались ВЭБ-ассоциированные изменения некоторых факторов (BIM/BCL2L1- Σ , PUMA/BBC3-NM_001127241, BID- Σ , CASP3- Σ , NFKB1- Σ , RELA- Σ). Также нами были обнаружены изменения уровней кодирующих и некодирующих транскриптов, ВЭБ-ассоциированный характер которых не описан в литературе (DCR1/TNFRSF10C-NM_003841, DR5/TNFRSF10B-NR_027140, CASP6 beta/CASP6-NM_032992, CASP7-NM_033338). Функциональные свойства данных молекул позволяют предположить их важную роль в патогенезе ВЭБ-ассоциированного мононуклеоза. В фазе реконвалесценции на фоне отсутствия клинических признаков заболевания уровни экспрессии некоторых мРНК оставались измененными по сравнению со здоровыми донорами (например, DCR2/TNFRSF10D-NM_003840, CASP8- Σ , CASP3- Σ , BIM/BCL2L1- Σ , BCL2-NM_000633, MCL1- Σ , BCL-W/BCL2L2- Σ , BCL-XL/BCL2L1-NM_138578,

Адрес для переписки:

Сахарнов Николай Александрович
603950, Россия, Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71,
ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии
им. акад. И.Н. Блохиной.
Тел.: 8 (831) 469-79-46 (служебн.); 8 950 624-87-12 (моб.).
Факс: 8 (831) 469-79-20.
E-mail: saharinov@nniem.ru; saharinov_n@mail.ru

Contacts:

Nikolai A. Sakharnov
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod, Malaya
Yamskaya str., 71, Blokhina Scientific Research Institute
of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 (831) 469-79-46 (office); +7 950 624-87-12 (mobile).
Fax: +7 (831) 469-79-20.
E-mail: saharinov@nniem.ru; saharinov_n@mail.ru

Библиографическое описание:

Сахарнов Н.А., Уткин О.В., Филатова Е.Н., Князев Д.И., Преснякова Н.Б.
Анализ экспрессии мРНК основных участников сигналинга апоптоза
и выживания в лейкоцитах крови детей с острым ВЭБ-инфекционным
мононуклеозом // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6. С. 723–734.
doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-723-734

Citation:

Sakharnov N.A., Utkin O.V., Filatova E.N., Knyazev D.I., Presnyakova N.B.
Apoptosis- and survival-related gene mRNA profile in peripheral blood
leukocytes in children with acute EBV infectious mononucleosis // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9,
no. 5–6, pp. 723–734. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-723-734

BIRC2-NM_001166, XIAP-NM_001167, TRAF2-NM_021138, MAP3K14- Σ , NFKB1- Σ), что может указывать на наличие отдаленных молекулярных последствий ВЭБ-ассоциированного мононуклеоза. Данные изменения могут обуславливаться, с одной стороны, пролонгированным иммунным ответом на инфекцию, а с другой стороны, происходить под влиянием ВЭБ-ассоциированных факторов, облегчающих персистенцию вируса в организме. В целом выявленные нами молекулярные особенности течения заболевания указывают на формирование предпосылок для хронизации инфекционного процесса. Полученные данные расширяют существующие представления о молекулярных механизмах патогенеза ВЭБ-инфекционного мононуклеоза.

Ключевые слова: ВЭБ-инфекционный мононуклеоз, лейкоциты, уровни экспрессии мРНК, сигнальные пути апоптоза и выживания.

APOPTOSIS- AND SURVIVAL-RELATED GENE mRNA PROFILE IN PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES IN CHILDREN WITH ACUTE EBV INFECTIOUS MONONUCLEOSIS

Sakharnov N.A., Utkin O.V., Filatova E.N., Knyazev D.I., Presnyakova N.B.

Blokhina Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Abstract. Acute EBV-associated mononucleosis develops mainly in children and in patients with functionally impaired immune system. Consequently, it may result in developing secondary immunodeficiency, neoplasms as well as diverse alterations in cell-mediated immune reaction. Despite extensively examining molecular mechanisms of EBV infection, it is also necessary seek for new molecular and genetic factors underlying pathogenesis of EBV-mediated mononucleosis and EBV-associated malignant cell transformation is necessary, which might be used in clinical practice to monitor clinical score as well as predictive parameters for EBV-associated complications such as immunocompromised conditions and neoplasms. Here, we proposed to use our splicing sensitive DNA microarrays to perform a comprehensive semi-quantitative mRNA expression analysis for major apoptosis- and survival-related signaling components in peripheral blood leukocytes collected from children with acute EBV infectious mononucleosis as well as during recovery period. Using such DNA microchips allowed to assess both total (denoted by Σ) and separate transcript expression resulting from alternative splicing. It was shown that the balance of mRNA levels in acute phase of EBV-infectious mononucleosis was shifted towards upregulated expression of anti-apoptotic factors and components of NF- κ B-linked pro-survival signaling able to profoundly augment apoptosis resistance. Moreover, some EBV-associated changes (BIM/BCL2L11- Σ , PUMA/BBC3-NM_001127241, BID- Σ , CASP3- Σ , NFKB1- Σ , RELA- Σ) were in agreement with the data published before. In addition, we also found previously unknown changes in level of EBV-associated coding and noncoding transcripts (DCR1/TNFRSF10C-NM_003841, DR5/TNFRSF10B-NR_027140, CASP6 beta/CASP6-NM_032992, CASP7-NM_033338). Analyzing their properties allowed to suggest that they play an important role in the pathogenesis of EBV-associated mononucleosis. However, at asymptomatic recovery stage, level of some mRNA expression was kept altered compared to healthy volunteers (DCR2/TNFRSF10D-NM_003840, CASP8- Σ , CASP3- Σ , BIM/BCL2L11- Σ , BCL2-NM_000633, MCL1- Σ , BCL-W/BCL2L2- Σ , BCL-XL/BCL2L1-NM_138578, BIRC2-NM_001166, XIAP-NM_001167, TRAF2-NM_021138, MAP3K14- Σ , NFKB1- Σ), which may point at postponed EBV-associated molecular consequences. On one hand, such changes may be due to long-lasting anti-EBV immune response, whereas, on the other hand, they might be influenced by EBV-associated factors facilitating virus persistence. Overall, we identified the molecular features predisposing to chronic course of EBV-infection. The data obtained further expand our understanding about the molecular pathogenetic mechanisms for EBV infectious mononucleosis.

Key words: EBV-infectious mononucleosis, leukocytes, mRNA expression levels, apoptotic and survival pathways.

Введение

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) — широко распространенный лимфотропный герпесвирус человека, носителями которого являются более 90% мирового населения. В большинстве случаев первичная ВЭБ-инфекция протекает бессимптомно. Острый ВЭБ-ассоциированный мононуклеоз развивается преимущественно у детей и у пациентов с функциональными нарушениями иммунитета. ВЭБ сохраняется в организме пожизненно в фазе латенции. Последствием перенесенной инфекции могут быть развитие вторичной иммунной недостаточности и различные нарушения клеточных иммунных реакций [2].

ВЭБ инфицирует преимущественно В-лимфоциты, а также Т-лимфоциты, натуральные киллеры и другие клетки [6].

При определенных условиях ВЭБ может инициировать развитие В-, Т- и НК-клеточных лимфом, а также других новообразований [17, 26, 51].

Ежегодно в мире регистрируется около 200 тыс. случаев онкологических заболеваний, этиологическим фактором которых является ВЭБ [13].

Несмотря на активное изучение молекулярных механизмов ВЭБ-инфекции, до сих пор не разработаны эффективные таргетные методы терапии, а также специфические ВЭБ-ориентированные вакцины. Необходим поиск

молекулярно-генетических факторов патогенеза ВЭБ-опосредованного мононуклеоза и ВЭБ-ассоциированной злокачественной трансформации клеток, которые могут быть использованы в клинической практике для мониторинга течения инфекции и в качестве предиктивных показателей риска развития ВЭБ-ассоциированных осложнений в виде иммунодефицита, новообразований и др. [49].

Известно, что продукты генома ВЭБ способны ингибировать сигнальные пути апоптоза, обеспечивая экранирование инфицированных клеток от воздействия иммунного ответа [22, 45].

Модуляция активности апоптоз-ассоциированных сигнальных путей осуществляется, в том числе, через регуляцию транскрипции, например, изменения уровней мРНК, кодирующих про- и антиапоптотические факторы [43].

Необходимо отметить, что с помощью альтернативного сплайсинга пре-мРНК из одного гена могут образовываться транскрипты, кодирующие белки с различными свойствами или функциями (вплоть до антагонистических), а также выполняющие регуляторную роль (например, не кодирующие транскрипты) [5, 34].

ВЭБ-ассоциированные изменения уровней мРНК основных участников сигнальных путей апоптоза и выживания могут являться важными факторами патогенеза ВЭБ-инфекции.

Для комплексного анализа большого количества гетерогенных мРНК традиционные методы исследования (ОТ-ПЦР и его различные варианты) являются трудоемкими и финансово затратными. Одним из возможных инструментов для решения таких задач являются сплайсинг-чувствительные ДНК-микрочипы, которые позволяют провести одновременную детекцию и полуколичественный анализ нескольких тысяч транскриптов [30].

Целью данной работы явилась оценка экспрессии генов сигналинга апоптоза и выживания в рамках изучения молекулярных особенностей патогенеза ВЭБ-инфекции. Для этого с помощью разработанных нами ДНК-микрочипов был проведен полуколичественный анализ экспрессии мРНК основных участников сигнальных путей апоптоза и выживания в лейкоцитах крови детей с острым ВЭБ-инфекционным мононуклеозом и в период реконвалесценции.

Материалы и методы

Материалом исследования явились образцы лейкоцитов крови, полученные от пациентов в возрасте 7–17 лет с диагнозом «Первичный острый ВЭБ-инфекционный мононуклеоз» (ВЭБ, $n = 18$) и в фазе реконвалесценции после исчезновения клинических признаков заболевания (повторный забор биоматериала осуществлялся через 2–2,5 месяца) (РЕК, $n = 18$). В качестве группы сравнения выступали практически

здоровые доноры сопоставимого пола и возраста без клинических и лабораторных признаков заболевания (НОРМ, $n = 51$).

Дизайн микрочипа. С помощью разработанного нами ранее алгоритма «Splice variants microarray design pipeline» [46] были выбраны последовательности ДНК-зондов, специфичных для индивидуальных мРНК 450 генов сигналинга апоптоза и выживания.

Дизайн микрочипа моделировался на основе кодирующих (NM_Protein-coding) и не кодирующих (NR_Non-protein-coding) последовательностей мРНК, аннотированных в базе данных RefSeq NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq>). Из-за высокой степени сходства между индивидуальными мРНК в рамках одного гена явилось невозможным подобрать последовательности зондов, специфичные для каждой из них. Поэтому были дополнительно выбраны последовательности групповых зондов, специфичных для последовательностей более 70% транскриптов гена (маркированы в тексте статьи знаком — Σ). Групповые ДНК-зонды использовались для оценки суммарной экспрессии генов. Разработанный микрочип содержит 1180 ДНК-зондов, детектирующих индивидуальные мРНК, и 367 групповых ДНК-зондов. Синтез ДНК-зондов был проведен на слайдах 12K microarray *in situ* с помощью аппарата V3 Synthesizer (CustomArray Inc., WA, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Пробоподготовка образцов мРНК для гибридизации на микрочип. Образцы крови обрабатывались раствором «Гемолитик» (ЦНИИЭ, Россия) для удаления эритроцитов. Из полученной фракции лейкоцитов выделялась тотальная РНК с помощью набора «Магно-сорб» (ЦНИИЭ, Россия) с последующей очисткой и концентрацией с помощью фенол-хлороформа. Тотальная мРНК (1,5–2 мкг) подвергалась обратной транскрипции и достройке второй цепи кДНК с помощью набора «Mint cDNA synthesis kit» (Евроген, Россия). Полученная двуцепочечная кДНК амплифицировалась в ходе ПЦР с помощью набора «Encyclo» (Евроген, Россия) по программе (95°C 25 с — 60°C 25 с — 72°C 6 мин). Амплифицированная кДНК (2 мкг) подвергалась транскрипции с помощью набора «T7 RNA-polymerase» (Thermo Scientific, EU). Половина количества уридинтрифосфатов (УТР) в реакционной смеси была заменена на биотинилированные уридинтрифосфаты (ДНК-синтез, Россия), в результате получали пул биотин-меченой РНК, обратно комплементарной мРНК исследуемого образца. Фрагментированная биотин-меченая РНК (2 мкг) гибридизовалась на микрочипы при 40°C в течение 18–20 ч. Процессинг микрочипов (блокирование, мечение, отмывка и внесение субстрата) выполнялся с помощью набора «ElectraSense Detection Kit» (CustomArray Inc., США) в соответствии с протоколом про-

изготовителя. Считывание сигналов гибридизации проводилось амперометрическим методом с помощью «ElectraSense Reader» и программы ElectraSense application software (CustomArray Inc., США).

Алгоритм обработки данных. Полуколичественный анализ уровней экспрессии мРНК проводился по следующему алгоритму: каждый исследуемый образец мРНК был гибридизован на микрочип в трех повторностях. Полученные сигналы гибридизации в виде .esd файлов были экспортированы в csv. файлы с помощью программы ElectraSense Analysis 3.4.2. Все расчеты проводились в свободно распространяемых средах программирования Python или R. Данные были нормализованы с помощью алгоритма квантильной нормализации по неспецифическому контролю [50].

Для измерения относительного уровня экспрессии мРНК (FC/fold-change) использовались средние значения уровней сигналов гибридизации каждого ДНК-зонда в отдельных выборках образцов ВЭБ, РЕК и НОРМ. Далее проводились сравнения средних значений сигналов в выборках ВЭБ/НОРМ и РЕК/НОРМ с использованием Т-теста с поправкой на ожидаемую долю ложных отклонений (FDR/False discovery rate test) [36]. В качестве порогового уровня значимости был выбран $q = 0,05$.

Относительный уровень экспрессии мРНК (fold-change/FC) рассчитывался по формулам:

$$FC \text{ ВЭБ}\% = (\text{сред. ВЭБ} \times 100 / \text{сред. НОРМ}) - 100;$$

$$FC \text{ РЕК}\% = (\text{сред. РЕК} \times 100 / \text{сред. НОРМ}) - 100.$$

По данным литературы [36] известно, что для более объективного анализа экспрессии мРНК методом ДНК-микрочипов необходимо учитывать не только статистически значимые различия сигналов, но и ранжировать их по диапазону изменения, эмпирически определяя функциональный пороговый уровень. Учитывая то, что нами изучалась экспрессия мРНК, регулирующих базовые физиологические процессы в пуле лейкоцитов крови, состоящих из различных субпопуляций клеток, а также сравнивались средние показатели в выборках образцов, ожидаемый диапазон изменений уровней мРНК не является большим. В связи с этим, а также исходя из диапазона полученных нами данных, был выбран пороговый уровень изменений сигналов $FC \pm 10\%$.

Таким образом, критериями для отбора новых, не охарактеризованных ранее факторов патогенеза ВЭБ-опосредованного мононуклеоза являлись: статистическая значимость изменений уровней мРНК ($q < 0,05$), диапазон их вариации $FC \pm 10\%$, подтверждение ВЭБ-ассоциированного характера уровней экспрессии исследуемых транскриптов в литературе (по возможности).

Результаты

Анализируемые мРНК были сгруппированы нами по их функциональной роли в сигнальных каскадах апоптоза и выживания. Оценивались изменения уровней экспрессии мРНК элементов апоптотического мембранного комплекса DISC (Death inducing signaling complex), митохондриального пути апоптоза, эффекторных каспаз и NF-κB-опосредованного сигналинга выживания.

Изменения уровней экспрессии мРНК элементов апоптотического мембранного комплекса DISC

В острой фазе заболевания выявлялось существенное снижение суммарной экспрессии генов, а также уровней индивидуальных мРНК проапоптотических факторов мембранного комплекса смерти DISC: лиганда смерти TRAIL/TNFSF10-NM_003810, рецептора смерти DR5/TNFRSF10B-Σ, медиатора FADD-NM_003824 и инициаторной каспазы CASP8-Σ (табл. 1).

С другой стороны, в острой фазе заболевания детектировалось значительное повышение уровней экспрессии мРНК некоторых факторов, ингибирующих активацию DISC, — некодирующей мРНК рецептора смерти DR5/TNFRSF10B-NR_027140, рецепторов-ловушек TRAIL—DCR1/TNFRSF10C-NM_003841 и DCR2/TNFRSF10D-NM_003840, а также ингибитора каспазы-8 — cFLIP/CFLAR-NM_001202516 (табл. 1).

В фазе реконвалесценции уровни экспрессии большинства перечисленных транскриптов нормализовались, но при этом оставались значительно сниженными уровни мРНК рецептора-ловушки DCR2/TNFRSF10D-NM_003840 и гена каспазы CASP8-Σ (табл. 1).

Изменения уровней экспрессии мРНК элементов митохондриального пути апоптоза

В острой фазе заболевания снижалась суммарная экспрессия генов, а также индивидуальных уровней мРНК ряда проапоптотических факторов митохондриального пути апоптоза: Puma/BBC3-NM_001127241, BAK1-Σ, BID-Σ и BIM/BCL2L11-Σ. В фазе реконвалесценции суммарный уровень экспрессии BIM/BCL2L11-Σ оставался значительно сниженным, уровни мРНК других проапоптотических факторов нормализовались (табл. 2).

В острой фазе заболевания снижалась суммарная экспрессия генов и уровня мРНК антиапоптотических митохондриальных факторов MCL1-Σ, BclW/BCL2L2-Σ и BCL2-NM_000633 соответственно. В то же время значительно возрастал уровень экспрессии мРНК антиапоптотического фактора BclXL/BCL2L1-NM_138578, который был сильно повышен и в фазе реконвалесценции. Также при реконвалесценции оставались сниженными уровни экспрессии мРНК

Таблица 1. Изменения уровней экспрессии мРНК генов комплекса DISC в острой фазе ВЭБ-инфекционного мононуклеоза и в период реконвалесценции
 Table 1. Changes of the mRNA expression levels of DISC complex genes in the acute phase of EBV-infectious mononucleosis and during the recovery period

Название гена и номер транскрипта в GenBank Gene name and transcript number in GenBank	Относительный уровень экспрессии, FC (%) в острой фазе, qVal Relative expression level, FC% in acute phase, qVal	Относительный уровень экспрессии, FC (%) в фазе реконвалесценции, qVal Relative expression level, % in recovery phase, qVal	Название гена и номер транскрипта в GenBank Gene name and transcript number in GenBank	Относительный уровень экспрессии, FC (%) в острой фазе, qVal Relative expression level, FC% in acute phase, qVal	Относительный уровень экспрессии, FC (%) в фазе реконвалесценции, qVal Relative expression level, % in recovery phase, qVal
Проапоптотические факторы комплекса DISC Pro-apoptotic factors of the DISC complex					
TRAIL/TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand/ TNFSF10-NM_003810	-25,028 q < 0,001	-5,965 q = 0,461	Death receptor 5/ TNFRSF10B-NR_027140	20,256 q = 0,025	22,791 q = 0,106
Death receptor 5/DR5/ TNFRSF10B-Σ	-14,148 q = 0,046	-9,863 q = 0,109	Decoy receptor 1/DCR1/ TNFRSF10C-NM_003841	20,715 q = 0,03	16,873 q = 0,213
FADD/FAS-Associated Death Domain Protein/ FADD-NM_003824	-27,629 q = 0,006	2,367 q = 0,788	Decoy receptor 2/DCR2/ TNFRSF10D-NM_003840	29,228 q = 0,007	26,948 q < 0,001
Caspase-8/CASP8-Σ	-19,433 q = 0,018	-15,97 q = 0,034	CASP8 and FADD Like Apoptosis Regulator/cFLIP/ CFLAR-NM_001202516	28,706 q < 0,001	9,999 q = 0,151

Примечание. Σ — суммарный уровень экспрессии гена.
 Note. Σ — is the total level of gene expression.

Таблица 2. Изменения уровней экспрессии мРНК генов митохондриального пути апоптоза и выживания в острой фазе ВЭБ-инфекционного мононуклеоза и в период реконвалесценции
 Table 2. Changes of the mRNA expression levels of mitochondrial signaling genes in the acute phase of EBV-infectious mononucleosis and during the recovery period

Название гена и номер транскрипта в GenBank Gene name and transcript number in GenBank	Относительный уровень экспрессии, FC (%) в острой фазе, qVal Relative expression level, FC% in acute phase, qVal	Относительный уровень экспрессии, FC (%) в фазе реконвалесценции, qVal Relative expression level, % in recovery phase, qVal	Название гена и номер транскрипта в GenBank Gene name and transcript number in GenBank	Относительный уровень экспрессии, FC (%) в острой фазе, qVal Relative expression level, FC% in acute phase, qVal	Относительный уровень экспрессии, FC (%) в фазе реконвалесценции, qVal Relative expression level, % in recovery phase, qVal
Проапоптотические факторы митохондриального пути апоптоза Pro-apoptotic factors of the mitochondrial apoptotic signaling					
BBC3/Bcl-2-Binding Component 3/Puma/ BBC3-NM_001127241	-23,494 q = 0,04	26,997 q = 0,409	Bcl-xL/ BCL2 Like 1// BCL2L1-NM_138578	62,134 q = 0,004	62,496 q = 0,002
BAK/BCL2 Antagonist/ Killer 1/BAK1-Σ	-25,35 q = 0,018	-2,992 q = 0,745	B-Cell CLL/Lymphoma 2/ Apoptosis Regulator Bcl-2/ BCL2-NM_000633	-24,364 q < 0,001	-14,210 q = 0,017
BH3-Interacting Domain Death Agonist/BID-Σ	-20,756 q = 0,003	-1,452 q = 0,828	Induced Myeloid Leukemia Cell Differentiation Protein Mcl-1/MCL1-Σ	-34,549 q = 0,005	-26,579 q = 0,018
BIM/Bcl-2 Interacting Mediator Of Cell Death/ BCL2L11-Σ	-54,127 q < 0,001	-64,814 q < 0,001	Apoptosis Regulator BCLW/BCL2L2-Σ	-26,403 q = 0,004	-21,162 q = 0,024

Примечание. Σ — суммарный уровень экспрессии гена.
 Note. Σ — is the total level of gene expression.

Таблица 3. Изменения уровней экспрессии мРНК генов эффекторной фазы апоптоза в острой фазе ВЭБ-инфекционного мононуклеоза и в период реконвалесценции

Table 3. Changes of the mRNA expression levels of effector apoptotic genes in the acute phase of EBV-infectious mononucleosis and during the recovery period

Название гена и номер транскрипта в GenBank Gene name and transcript number in GenBank	Относительный уровень экспрессии, FC (%) в острой фазе, qVal Relative expression level, FC% in acute phase, qVal	Относительный уровень экспрессии, FC (%) в фазе реконвалесценции, qVal Relative expression level, % in recovery phase, qVal
Эффекторные каспазы Effector caspases		
<i>Caspase-3/CASP3-Σ</i>	-17,755, q = 0,037	-18,954, q = 0,009
<i>Caspase-7/CASP7-Σ</i>	-15,464, q = 0,002	-15,541, q = 0,001
<i>Caspase-7/CASP7-NM_033338</i>	-14,752, q = 0,04	-4,005, q = 0,404
<i>Caspase-6/CASP6 beta/CASP6-NM_032992</i>	18,067, q = 0,008	9,601, q = 0,138
Ингибиторы эффекторных каспаз Inhibitors of effector caspases		
<i>Vacuolar IAP Repeat-Containing Protein 2/BIRC2-NM_001166</i>	22,713, q = 0,009	17,73, q = 0,029
<i>X-Linked Inhibitor Of Apoptosis/XIAP-NM_001167</i>	27,613, q = 0,047	18,903, q = 0,04

Примечание. Σ — суммарный уровень экспрессии гена.

Note. Σ — the total level of gene expression.

Таблица 4. Изменения уровней экспрессии мРНК генов NF-κB-сигналинга выживания в острой фазе ВЭБ-инфекционного мононуклеоза и в период реконвалесценции

Table 4. Changes of the mRNA expression levels of effector apoptotic and NF-κB survival genes in the acute phase of EBV-infectious mononucleosis and during the recovery period

Название гена и номер транскрипта в GenBank Gene name and transcript number in GenBank	Относительный уровень экспрессии, FC (%) в острой фазе, qVal Relative expression level, FC% in acute phase, qVal	Относительный уровень экспрессии, FC (%) в фазе реконвалесценции, qVal Relative expression level, % in recovery phase, qVal
Участники NF-κB-зависимого сигналинга выживания Participants in NF-κB-dependent survival signaling		
<i>TRAF2/TNF Receptor Associated Factor 2/TRAF2-NM_021138</i>	16,974, q = 0,043	14,388, q = 0,026
<i>NF-κappa-Beta-Inducing Kinase/NIK/MAP3K14-Σ</i>	22,927, q = 0,009	16,907, q = 0,011
<i>NEMO/I-κappa-B Kinase Subunit Gamma/IKBG-Σ</i>	25,903, q = 0,006	10,726, q = 0,235
<i>NFKB1/Nuclear Factor Kappa B Subunit 1/p50/NFKB1-Σ</i>	19,399, q = 0,01	16,632, q = 0,049
<i>RELA Proto-Oncogene, NF-κB Subunit/p65/RELA-Σ</i>	17,5807, q = 0,02	4,416, q = 0,290
<i>NFKB2/Nuclear Factor Kappa B Subunit 2/NFKB2-NM_001077494</i>	10,102, q = 0,044	5,356, q = 0,283
<i>RELB Proto-Oncogene, NF-κB Subunit/RELB-NM_006509</i>	14,251, q = 0,01	13,421, q = 0,012

Примечание. Σ — суммарный уровень экспрессии гена.

Note. Σ — the total level of gene expression.

других вышеназванных антиапоптотических факторов — BCL2-NM_000633, MCL1-Σ и BclW/BCL2L2-Σ (табл. 2). Отметим, что независимо от периода заболевания (острый или реконвалесценция) уровни экспрессии мРНК структурных элементов митохондриальной апоптосомы (в составе каспазы-9, цитохрома С и APAF-1) не изменялись.

Изменения уровней экспрессии мРНК эффекторных каспаз

В острой фазе заболевания детектировалось снижение суммарных и индивидуальных уровней экспрессии мРНК эффекторных каспаз CASP3-Σ, CASP7-Σ и CASP7-NM_033338. Одновременно с этим повышалась экспрессия транскрипта CASP6 beta/CASP6-NM_032992, кодирующего вариант каспазы-6, блокирующий передачу цитотоксического сигнала [33] (табл. 3).

Необходимо отметить, что в острой фазе заболевания нами наблюдалось повышение уровней экспрессии мРНК ингибиторов каспаз cIAP1/BIRC2-NM_001166 и XIAP-NM_001167, которые оставались повышенными и в фазе реконвалесценции. Также в период реконвалесценции оставались сниженными суммарные и индивидуальные уровни экспрессии мРНК эффекторных каспаз CASP3-Σ и CASP7-Σ, при этом нормализовались уровни мРНК CASP6-NM_032992 и CASP7-NM_033338 (табл. 3).

Изменения уровней экспрессии мРНК элементов NF-κB-опосредованного сигналинга

В острой фазе заболевания выявлялось повышение суммарных и индивидуальных уровней экспрессии мРНК элементов активации NF-κB-зависимого сигналинга: медиатора TRAF2-NM_021138, киназ NIK/MAP3K14-Σ и NEMO/IKBKG-Σ, а также участников NF-κB-опосредованного транскрипционного комплекса — p50/NFKB1-Σ, p65/RELA-Σ и RELB-NM_006509 (табл. 4).

В фазе реконвалесценции уровни экспрессии большинства мРНК оставались повышенными и нормализовались только суммарные уровни мРНК NEMO/IKBKG-Σ и p65/RELA-Σ (табл. 4).

Обсуждение

В целом полученные нами данные указывают на то, что в острой фазе ВЭБ-инфекционного мононуклеоза баланс уровней мРНК смещается в сторону снижения проапоптотических и повышения антиапоптотических транскриптов, а также элементов NF-κB-опосредованного сигналинга, что может играть существенную роль в повышении выживаемости клеток.

Литературными данными подтверждаются ВЭБ-ассоциированные изменения некоторых сигнальных факторов (BID-Σ [44], RELA-Σ [10, 11] и др.).

Также обнаружены изменения уровней кодирующих и некодирующих транскриптов, ВЭБ-ассоциированный характер которых не описан в литературе (CASP6 beta/CASP6-NM_032992, DR5/TNFRSF10B-NR_027140 и др.). Однако функциональные свойства таких молекул позволяют предположить их важную роль в патогенезе ВЭБ-ассоциированного мононуклеоза. В фазе реконвалесценции на фоне отсутствия клинических признаков заболевания уровни экспрессии некоторых мРНК оставались измененными по сравнению со здоровыми донорами (CASP3-Σ, BclW/BCL2L1-Σ, NFKB1-Σ и др.). Существует несколько возможных объяснений выявленной картины экспрессии. С одной стороны, они могут отражать особенности молекулярных механизмов пролонгированного восстановления функционального состояния иммунитета вследствие выраженных изменений уровней экспрессии целевых мРНК в острой фазе ВЭБ-инфекционного мононуклеоза. С другой стороны, альтерация картины экспрессии изучаемых мРНК у выздоравливающих пациентов может происходить на фоне продолжающегося влияния продуктов генома ВЭБ, наличие ДНК которого в исследуемых образцах лейкоцитов крови выявлялось нами в клинически не значимой концентрации по результатам ПЦР в реальном времени (данные ПЦР-анализа в статье не приведены). Например, по данным литературы под воздействием латентного белка ВЭБ LMP1 происходит активация NF-κB-зависимого сигналинга выживания [21, 23].

Нами в фазе реконвалесценции детектировалось повышение уровней мРНК факторов активации NF-κB-опосредованного сигналинга — TRAF2-NM_021138, NIK/MAP3K14-Σ, NFKB1-Σ, RELB-NM_006509. Таким образом, данные транскрипты могут являться важными звеньями в цепи факторов патогенеза ВЭБ-инфекционного мононуклеоза.

Помимо выявленных нами отдаленных молекулярных последствий данного заболевания аналогичная особенность его течения регистрируется, по данным литературы, и на клеточном уровне. Так, у детей 6–17 лет, показатели клинического анамнеза которых были сопоставимы с таковыми в нашей исследуемой группе пациентов, через 1,5–6 месяцев после манифестации ВЭБ-инфекционного мононуклеоза выявлялись существенные отклонения в содержании CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, свидетельствующие о формировании вторичного иммунодефицита. При этом у части пациентов сохранялось повышенным содержание CD45RA⁺RO45⁺ клеток, что указывало на продолжающийся иммунный ответ на инфекцию. В целом регистрируемые нами молекулярные и описанные в литературе клеточные особенности течения заболевания указывают на формирование предпосылок для хронизации инфекционного процесса [1].

Выделяют два основных сигнальных пути апоптоза клеток, к которым относят внешний, реализуемый при участии мембранных рецепторов смерти, и внутренний, митохондриальный путь. Оба пути приводят к активации ключевых эффекторов апоптоза — каспаз-3, -6 и -7, которые вызывают протеолиз широкого спектра структурных и функциональных белков клетки [4].

Формирование молекулярного комплекса DISC (death inducing signaling complex) является начальным этапом реализации внешнего сигнального пути апоптоза. В состав DISC входит тример одного из лигандов (FasL, TRAIL) и, соответственно, рецепторов смерти (Fas, DR4 или DR5), медиатор FADD (Fas-associated death domain) и инициаторная каспаза-8. DISC инициирует каскадную активацию эффекторных каспаз-3, -6, и -7, а также может протеолитически активировать митохондриальный фактор BID, который инициирует внутренний путь апоптоза. Ингибиторами DISC являются cFLIP/cFLAR (ингибитор каспазы-8) и рецепторы-ловушки DCR1 и DCR2, которые конкурируют с рецепторами смерти DR4 и DR5 за связывание лиганда TRAIL [3, 4].

В острой фазе ВЭБ-инфекционного мононуклеоза нами впервые получены данные о снижении экспрессии мРНК проапоптотических факторов комплекса DISC — лиганда смерти TRAIL/TNFSF10-NM_003810, рецептора смерти DR5- Σ , медиатора FADD-NM_003824 и инициаторной каспазы CASP-8- Σ , что свидетельствует в пользу комплексного ингибирования TRAIL/DR5-опосредованного апоптоза уже на начальных этапах апоптотического сигналинга. Также на это указывает повышение уровней экспрессии мРНК рецепторов-ловушек TRAIL — DCR1/TNFSF10C-NM_003841 и DCR2/TNFSF10D-NM_003840 и ингибитора каспазы-8 — cFLIP/cFLAR-NM_001202516. Известно, что рецепторы-ловушки DCR1 и DCR2 экспрессируются на мембране клеток и являются функциональными антагонистами рецептора смерти DR5, конкурируя с ним за связывание лиганда TRAIL. Связывая лиганд, рецепторы-ловушки блокируют передачу апоптотического сигнала в клетку [52].

Фактор cFLIP/cFLAR обладает высоким сродством к каспазе-8 и блокирует ее рекрутирование в комплекс DISC, препятствуя инициации внешнего пути апоптоза [27].

Интересен факт повышения уровня некодирующей мРНК рецептора смерти DR5/TNFSF10B-NR_027140 на фоне снижения уровня суммарной экспрессии гена DR5- Σ , свидетельствующий об уменьшении количества кодирующих белок мРНК, что также рассматривается нами в качестве возможного механизма ингибирования пусковых событий DR5/TRAIL-опосредованного апоптоза [5].

Отметим, что повышение уровня мРНК DCR2/TNFSF10D-NM_003840 и снижение суммарного уровня экспрессии гена CASP-8- Σ сохранялось и в период реконвалесценции, что также может вносить вклад в ингибирование TRAIL/DR5-опосредованного апоптоза.

По данным литературы рецептор смерти DR5 экспрессируется в широком спектре клеток, а сигнальные пути с участием TRAIL/DR5 играют важную роль в механизмах активации иммунных клеток и регуляции иммунного ответа [14, 28], а также в патогенетическом ингибировании апоптоза при различных вирусных заболеваниях (в частности, ВИЧ-инфекции [8] и гепатите В [18]). Рецепторы ловушки DCR1/TNFSF10C и DCR2/TNFSF10D также играют существенную роль в патогенезе ВИЧ-инфекции [52].

Данные о ВЭБ-опосредованных изменениях уровней мРНК каспазы-8 и ее ингибитора cFLIP/cFLAR подтверждаются литературными данными. Так, резистентные к апоптозу ВЭБ-позитивные клеточные линии В-клеточной лимфомы Беркитта характеризовались повышенными уровнями экспрессии мРНК антиапоптотического фактора FLIP(L), а соотношение уровней мРНК каспазы-8 и FLIP(L) коррелировало с чувствительностью клеток к апоптозу [48].

Результаты, свидетельствующие об участии транскрипционного варианта cFLIP/cFLAR-NM_001202516 в патогенезе ВЭБ-инфекции в литературе отсутствуют, но с учетом данных, подтверждающих его антиапоптотическую активность [27], можно предположить, что данный транскрипт участвует в повышении выживаемости инфицированных клеток.

Внутренний путь апоптоза под влиянием различных факторов инициируется при снижении проницаемости митохондриальной мембраны. В результате в цитозоль проникают проапоптотические факторы Araf-1 и цитохром С, которые объединяются с прокаспазой-9 в сигнальный комплекс — апоптосому. В рамках апоптосомы инициируется протеолитическая активация эффекторных каспаз. Ключевую роль в регуляции проницаемости митохондриальной мембраны играют белки семейства Bcl-2. Проапоптотические факторы (BAX, BAK, BID, BAD, PUMA и др.) усиливают транспорт ионов и других молекул, снижая барьерный потенциал митохондрий, а антиапоптотические факторы (BCL-2, BCL-XL, Bcl-W, MCL-1 и др.) ингибируют этот процесс [3].

В пользу ингибирования митохондриального пути апоптоза в острой фазе ВЭБ-инфекционного мононуклеоза говорит выявленное нами на уровне генов и отдельных транскриптов снижение экспрессии проапоптотических факторов BAK1- Σ BID- Σ , BIM/BCL2L11- Σ и PUMA/BBC3-NM_001127241. По данным литературы в модуляции митохондриального пути апоптоза участвуют многие продукты генома ВЭБ. Так, экспрес-

сия проапоптотического фактора PUMA ингибируется посредством микро-РНК ВЭБ BART5 в клетках ВЭБ-опосредованной носоглоточной карциномы [12].

Экспрессия проапоптотического фактора BID ингибируется микро-РНК ВЭБ miR-BART4-5p в опухолевых клетках ВЭБ-ассоциированного рака желудка [44].

Также в ВЭБ-инфицированных В-клетках белки ВЭБ EBNA3A и EBNA3C координированно ингибируют экспрессию мРНК проапоптотического фактора BIM [7, 38].

Отметим, что в фазе реконвалесценции уровни большинства проапоптотических факторов нормализовались, за исключением фактора BIM, суммарная экспрессия которого оставалась сниженной, вероятно, вследствие продолжающегося воздействия белков ВЭБ EBNA3A и EBNA3C.

Среди антиапоптотических элементов митохондриального пути апоптоза в острой фазе ВЭБ-инфекционного моноклеоза наблюдалось выраженное повышение уровня мРНК BCL-XL/BCL2L1-NM_138578, сохраняющееся и в период реконвалесценции, что, на наш взгляд, вносит существенный вклад в повышение выживаемости клеток и их резистентности к апоптозу. В то же время выявлено снижение уровней мРНК ряда других антиапоптотических транскриптов (BCL2-NM_000633, MCL1- Σ , BCL-W/BCL2L2- Σ), которое наблюдалось как в острой фазе заболевания, так и в период реконвалесценции. Мы полагаем, что такая разнонаправленность изменений антиапоптотических факторов в структуре митохондриального сигналинга является отражением сложной картины антагонистических взаимодействий между влиянием ВЭБ, направленным на выживание инфицированных клеток, и эффекторами иммунного ответа, участвующими в элиминации патогена. В литературе описаны продукты генома ВЭБ, которые могут как активировать, так и ингибировать экспрессию антиапоптотических факторов митохондриального пути апоптоза. Так, белок ВЭБ BZLF1 способен ингибировать экспрессию антиапоптотических факторов BCL-2 и BclXL в CD4⁺ Т-клетках в ходе литической фазы ВЭБ-инфекции [22, 32, 54], а белок ВЭБ EBNA2 усиливает экспрессию антиапоптотических молекул BFL-1, BCL-XL, BCL-2 и MCL-1 в ходе пролиферации и иммортализации В-клеток [25, 31, 53].

В повышении уровня мРНК BCL-XL опосредованно участвует мембранный белок ВЭБ LMP2 (latent membrane protein 2), активируя транскрипционный фактор NF- κ B, а также элементы Активированного сигналинга [22, 39, 47], что приводит к повышению выживаемости клеток.

Острая фаза ВЭБ-инфекционного моноклеоза характеризовалась снижением уровней экспрессии мРНК CASP3- Σ , CASP7- Σ , что явно свидетельствует об ингибировании апоптотичес-

кого сигналинга в эффекторной стадии. Кроме того, нами впервые показано, что в острую фазу заболевания повышался уровень мРНК CASP6 beta/CASP6-NM_032992, которая ингибирует активность основного функционального варианта эффекторной каспазы-6 [33].

Следует отметить, что ингибированию терминальной стадии апоптотического сигналинга также способствует повышение уровней экспрессии мРНК ингибиторов каспаз — cIAP1/BIRC2 (BIRC2-NM_001166) и XIAP (XIAP-NM_001167).

Снижение уровней мРНК каспазы-3 и -7, и повышение экспрессии их ингибиторов cIAP и XIAP сохранялось и в фазе реконвалесценции при отсутствии клинических признаков заболевания, что может являться фактором, облегчающим переход ВЭБ в латентную стадию и более успешную персистенцию вируса в организме. ВЭБ-ассоциированное ингибирование экспрессии каспаз описано в литературе. Так, под влиянием ВЭБ-кодируемой микро-РНК группы BART происходит снижение экспрессии эффекторной каспазы-3 [24].

Острая фаза ВЭБ-инфекционного моноклеоза характеризовалась повышением уровней мРНК некоторых элементов NF- κ B-опосредованного сигналинга, направляющего клетки преимущественно по пути выживания и пролиферации. Так, синхронно повышались уровни мРНК ключевых медиаторов (TRAF2-NM_021138), активаторов (NIK/MAP3K14- Σ и NEMO/IKBKG- Σ) и эффекторов (NF- κ B1- Σ , RELA- Σ и RELB-NM_006509) данного сигналинга. ВЭБ-ассоциированная активация NF- κ B-зависимого сигналинга подтверждается данными литературы. Так, мембранный белок ВЭБ LMP1 (latent membrane protein 1) по структурно-функциональным особенностям сходен с активным рецептором смерти TNFR1, инициирующим NF- κ B-опосредованный сигналинг [9, 20, 21, 23, 40, 41].

Медиатор TRAF2 является ключевой мишенью для белка LMP1. Мутации или нокаут гена TRAF2 блокировали LMP1-опосредованную активацию NF- κ B [15, 16, 19, 29].

NIK/MAP3K14-опосредованная активация NF- κ B также инициируется при участии LMP1 [35].

Фактор NEMO/IKBKG (повышение уровня мРНК которого выявлялось нами в острой фазе заболевания) является важным активатором транскрипционного комплекса NF- κ B1 в составе RelA/p65+NF- κ B1/p50 [42].

ВЭБ-ассоциированная активация элементов транскрипционного комплекса NF- κ B1 описана в литературе на примере опухолевых линий. Так, в ВЭБ-трансформированных В-клетках при участии белка ВЭБ BARF1 повышалась экспрессия RELA, усиливающая пролиферацию инфицированных лимфоцитов [10, 11].

В то же время ВЭБ-опосредованное повышение уровней мРНК RELB наблюдалось при реактивации ВЭБ в клеточных линиях рака желудка [37].

В период реконвалесценции уровни мРНК ряда инициаторных (TRAF2-NM_021138, NIK/MAP3K14-Σ) и эффекторных (p50/NFKB1-Σ, RELB-NM_006509) элементов NF-κB-зависимого сигналинга оставались повышенными, что может быть обусловлено, с одной стороны, «остаточной» вирусиндуцированной активацией иммунокомпетентных клеток, которая, по данным литературы, может сохраняться на клеточном уровне длительное время после перенесенной инфекции [1], а с другой стороны, продолжением влияния ВЭБ-ассоциированных факторов, направленных на сохранение патогена в латентном состоянии.

Заключение

С помощью разработанных нами ДНК-микрочипов проведен комплексный полуквантитативный анализ экспрессии мРНК 450 генов — участников сигнальных каскадов апоптоза и выживания в лейкоцитах крови детей при остром ВЭБ-ассоциированном мононуклеозе и в период реконвалесценции. Дизайн ДНК-микрочипа позволял детектировать изменения, как суммарной экспрессии генов, так и уровней индивидуальных мРНК в рамках одного гена. Нами показано, что баланс уровней мРНК в острой фазе ВЭБ-инфекционного мононуклеоза смещался в сторо-

ну повышения экспрессии антиапоптотических факторов и элементов NF-κB-зависимого сигналинга выживания, что может существенно усиливать резистентность клеток к апоптозу. Уровни мРНК ряда элементов сигнальных путей апоптоза и выживания оставались альтерированными в период реконвалесценции в отсутствие клинических признаков заболевания, что может указывать на наличие отдаленных молекулярных последствий ВЭБ-ассоциированного мононуклеоза. Данные изменения могут обуславливаться, с одной стороны, пролонгированным иммунным ответом на инфекцию, а с другой стороны, происходить под влиянием ВЭБ-ассоциированных факторов, облегчающих персистенцию вируса в организме. Полученные данные расширяют существующие представления о молекулярных механизмах патогенеза ВЭБ-инфекционного мононуклеоза. Выявленные нами существенные изменения уровней экспрессии мРНК некоторых из изученных факторов дают основание предполагать их важную роль в патогенезе ВЭБ-инфекционного мононуклеоза. А сами факторы, в качестве дополнительных к уже имеющимся, могут использоваться для комплексной оценки функционального состояния лейкоцитов крови в ходе острой фазы заболевания и в период реконвалесценции. Кроме того, данные факторы являются перспективными с точки зрения катамнестических исследований детей групп риска после выписки из клиники для контроля эффективности лечения и уменьшения риска хронизации заболевания.

Список литературы/References

1. Кудин А.П., Романовская Т.Р., Белевцев М.В. Состояние специфического иммунитета при инфекционном мононуклеозе у детей // Медицинский журнал. 2007. Т. 1, № 19. С. 102–106. [Kudin A.P., Romanovskaya T.R., Belevtsev M.V. The state of specific immunity in infectious mononucleosis in children. *Meditsinskiy zhurnal = Medical Journal*, 2007, vol. 1, no. 19, pp. 102–106. (In Russ.)]
2. Кускова Т.К., Белова Е.Г. Семейство герпесвирусов на современном этапе // Лечащий врач. 2004. Т. 5. С. 64–69. [Kuskova T.K., Belova E.G. Herpes viruses family at the present stage. *Lechashchiy vrach = The Attending Physician*, 2004, vol. 5, pp. 64–69. (In Russ.)]
3. Уткин О.В., Новиков В.В. Регуляция апоптоза с помощью альтернативного сплайсинга матричной РНК // Российский биотерапевтический журнал. 2007. Т. 6, № 2. С. 13–20. [Utkin O.V., Noviov V.V. Regulation of apoptosis using alternative splicing of mRNA. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal*, 2007, vol. 6, no. 2, pp. 13–20. (In Russ.)]
4. Уткин О.В., Новиков В.В. Рецепторы смерти в модуляции апоптоза // Успехи современной биологии. 2012. Т. 132, № 4. С. 381–390. [Utkin O.V., Noviov V.V. Death receptors in apoptotic modulation. *Uspekhi sovremennoy biologii = Advances in Modern Biology*, 2012, vol. 132, no. 4, pp. 381–390. (In Russ.)]
5. Филатова Е.Н., Уткин О.В. Роль некодирующих изоформ мРНК белок-кодирующих генов в регуляции генной экспрессии // Генетика. 2018. Т. 54, № 8. С. 879–887. [Filatova E.N., Utkin O.V. The role of noncoding mRNA isoforms in the regulation of gene expression. *Genetika = Russian Journal of Genetics*, 2018, vol. 54, no. 8, pp. 879–887. doi: 10.1134/S0016675818080052 (In Russ.)]
6. Филатова Е.Н., Уткин О.В. Современные подходы к моделированию герпесвирусной инфекции // Журнал МедиАль. 2014. Т. 2, № 12. С. 172–197. [Filatova E.N., Utkin O.V. Modern approaches to the modeling of herpes infection. *Zhurnal MediAl' = MediAl*, 2014, vol. 2, no. 12, pp. 172–197. (In Russ.)]
7. Anderton E., Yee J., Smith P., Crook T., White R.E., Allday M.J. Two Epstein–Barr virus (EBV) oncoproteins cooperate to repress expression of the proapoptotic tumor-suppressor Bim: clues to the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Oncogene*, 2008, vol. 27, no. 4, pp. 421–433. doi: 10.1038/sj.onc.1210668
8. Barblu L., Smith N., Durand S., Scott-Algara D., Boufassa F., Delfraissy J.F., Cimarelli A., Lamwotte O., Herbeval J.P. Reduction of death receptor 5 expression and apoptosis of CD4+ T cells from HIV controllers. *Clin. Immunol.*, 2014, vol. 155, no. 1, pp. 17–26. doi: 10.1016/j.clim.2014.07.010
9. Carmilleri-Broet B.S., Davi F., Feuillard J., Bourgeois C., Seilhean D., Hauw J.J., Raphaël M. High expression of latent membrane protein 1 of Epstein–Barr virus and BCL-2 oncoprotein in acquired immunodeficiency syndrome-related primary brain lymphomas. *Blood*, 1995, vol. 86, no. 2, pp. 432–435

10. Chang M.S., Kim D.H., Roh J.K., Middeldorp J.M., Kim Y.S., Kim S., Han S., Kim C.W., Lee B.L., Kim W.H., Woo J.H. Epstein–Barr virus-encoded BARF1 promotes proliferation of gastric carcinoma cells through regulation of NF- κ B. *J. Virol.*, 2013, vol. 87, no. 19, pp. 10515–10523. doi: 10.1128/JVI.00955-13
11. Chanut A., Duguet F., Marfak A., David A., Petit B., Parrens M., Durand-Panteix S., Boulon-Deveza M., Gachard N., Youlyouz-Marfak I., Bordessoule D., Feuillard J., Faumont N. RelA and RelB cross-talk and function in Epstein–Barr virus transformed B cells. *Leukemia*, 2014, vol. 28, no. 4, pp. 871–879. doi: 10.1038/leu.2013.274
12. Choy E.Y., Siu K.L., Kok K.H., Lung R.W., Tsang C.M., To K.F., Kwong D.L., Tsao S.W., Jin D.Y. An Epstein–Barr virus-encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival. *J. Exp. Med.*, 2008, vol. 205, no. 11, pp. 2551–2560. doi: 10.1084/jem.20072581
13. Cohen J.I., Fauci A.S., Varmus H., Nabel G.J., Epstein–Barr virus: an important vaccine target for cancer prevention. *Sci. Transl. Med.*, 2011, vol. 3: 107fs7. doi: 10.1126/scitranslmed.3002878
14. Collison A., Foster P.S., Mattes J. Emerging role of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a key regulator of inflammatory responses. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2009, vol. 36, no. 11, pp. 1049–1053. doi: 10.1111/j.1440-1681.2009.05258.x
15. Devergne O., Hatzivassiliou E., Izumi K.M., Kaye K.M., Kleijnen M.F., Kieff E., Mosialos G. TRAF1, TRAF2 and TRAF3 effect NF- κ B activation by an Epstein–Barr Virus LMP1 domain important for B lymphocyte transformation. *Mol. Cell Biol.*, 1996, vol. 16, pp. 7098–7107. doi: 10.1128/MCB.16.12.7098
16. Devergne O., McFarland E.C., Mosialos G., Izumi K.M., Ware C.F., Kieff E. Role of the TRAF binding site and NF- κ B activation in Epstein–Barr virus latent membrane protein 1-induced cell gene expression. *J. Virol.*, 1998, vol. 72, pp. 7900–7908.
17. Dojcinov S.D., Fend F., Quintanilla-Martinez L. EBV-positive lymphoproliferations of B-, T- and NK-cell derivation in non-immunocompromised hosts. *Pathogens*, 2018, vol. 7, p. 28. doi: 10.3390/pathogens7010028
18. Du J., Liang X., Liu Y., Qu Z., Gao L., Han L., Liu S., Cui M., Shi Y., Zhang Z., Yu L., Cao L., Ma C., Zhang L., Chen Y., Sun W. Hepatitis B virus core protein inhibits TRAIL-induced apoptosis of hepatocytes by blocking DR5 expression. *Cell Death Differ.*, 2009, vol. 16, no. 2, pp. 219–229. doi: 10.1038/cdd.2008.144
19. Eliopoulos A.G., Stack M., Dawson C.W., Kaye K.M., Hodgkin L., Sinota S., Rowe M., Young L.S. Epstein–Barr virus-encoded LMP1 and CD40 mediate IL-6 production in epithelial cells via an NF- κ B pathway involving TNF receptor associated factors. *Oncogene*, 1997, vol. 14, no. 24, pp. 2899–2916. doi: 10.1038/sj.onc.1201258
20. Eliopoulos A.G., Young L.S. LMP1 structure and signal transduction. *Semin. Cancer Biol.*, 2001, vol. 11, pp. 435–444. doi: 10.1006/schb.2001.0410
21. Floettmann J.E., Rowe M. Epstein–Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) C-terminus activation region 2 (CTAR2) maps to the far C-terminus and requires oligomerisation for NF- κ B activation. *Oncogene*, 1997, vol. 15, pp. 1851–1858. doi: 10.1038/sj.onc.1201359
22. Fu Q., He C., Mao Z.R. Epstein–Barr virus interactions with the Bcl-2 protein family and apoptosis in human tumor cells. *Journal of Zhejiang University. Science B. Biomedicine and Biotechnology*, 2013, vol. 14, no. 1, pp. 8–24. doi: 10.1631/jzus.B1200189
23. Gires O., Zimmer-Strobl U., Gonnella R., Ueffing M., Marschall G., Zeidler R., Pich D., Hammerschmidt W. Latent membrane protein 1 of Epstein–Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *EMBO J.*, 1997, vol. 16, pp. 6131–6140. doi: 10.1093/emboj/16.20.6131
24. Harold C., Cox D., Riley K.J. Epstein–Barr viral microRNAs target caspase 3. *Virol. J.*, 2016, vol. 13: v145. doi: 10.1186/s12985-016-0602-7
25. Hayward S.D. Viral interactions with the Notch pathway. *Semin. Cancer Biol.*, 2004, vol. 14, no. 5, pp. 387–396. doi: 10.1016/j.semcancer.2004.04.018
26. Hjalgrim H., Askling J., Sørensen P., Madsen M., Rosdahl N., Storm H.H., Hamilton-Dutoit S., Eriksen L.S., Frisch M., Ekbom A., Melbye M. Risk of Hodgkin’s disease and other cancers after infectious mononucleosis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000, vol. 92, no. 18, pp. 1522–1528
27. Irmeler M., Thome M., Hahne M., Schneider P., Hofmann K., Steiner V., Bodmer J.L., Schroter M., Burns K., Mattmann C., Rimoldi D., French L.E., Tschopp J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 1997, vol. 388, no. 6638, pp. 190–195. doi: 10.1038/40657
28. Iyori M., Zhang T., Pantel H., Gagne B.A., Sentman C.L. TRAIL/DR5 plays a critical role in NK cell-mediated negative regulation of dendritic cell cross-priming of T cells. *J. Immunol.*, 2011, vol. 187, no. 6, pp. 3087–3095. doi: 10.4049/jimmunol.1003879
29. Kaye K.M., Devergne O., Harada J.N., Izumi K.M., Yalamanchili R., Kieff E., Mosialos G. Tumour necrosis factor receptor associated factor 2 is a mediator of NF- κ B activation by latent infection membrane protein 1, the Epstein–Barr virus transforming protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, pp. 11085–11090
30. Knyazev D.I., Starikova V.D., Utkin O.V., Solntsev L.A., Sakharnov N.A., Efimov E.I. Splicing-sensitive DNA-microarrays: peculiarities and application in biomedical research. *CTM*, 2015, vol. 7, no. 4, pp. 162–172. doi: 10.17691/stm2015.7.4.23
31. Kohlhof H., Hampel F., Hoffmann R., Burtscher H., Weidle U.H., Holzel M., Eick D., Zimmer-Strobl U., Strobl L. J. Notch1, Notch 2 and Epstein–Barr virus-encoded nuclear antigen 2 signaling differentially affects proliferation and survival of Epstein–Barr virus-infected B cells. *Blood*, 2009, vol. 113, no. 22, pp. 5506–5515. doi: 10.1182/blood-2008-11-190090
32. Lantner F., Starlets D., Gore Y., Flaishon L., Yamit-Hezi A., Dikstein R., Leng L., Bucala R., Machluf Y., Oren M., Shachar I. CD74 induces TAp63 expression leading to B-cell survival. *Blood*, 2007, vol. 110, no. 13, pp. 4303–4311. doi: 10.1182/blood-2007-04-087486
33. Lee A.W., Champagne N., Wang X., Su X.D., Goodyer C., Leblanc A.C. Alternatively spliced caspase-6B isoform inhibits the activation of caspase-6A. *J. Biol. Chem.*, 2010, vol. 285, no. 42, pp. 31974–31984. doi: 10.1074/jbc.M110.152744
34. Lee Y., Rio D.C. Mechanisms and regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.*, 2015, vol. 84, pp. 291–323. doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-034316
35. Luftig M., Yasui T., Soni V., Kang M.S., Jacobson N., Cahir-McFarland E., Seed B., Kieff E. Epstein–Barr virus latent infection membrane protein 1 TRAF-binding site induces NIK/IKK alpha-dependent noncanonical NF- κ B activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, vol. 101, no. 1, pp. 141–146. doi: 10.1073/pnas.2237183100
36. McCarthy D. J., Smyth G. K. Testing significance relative to a fold-change threshold is a TREAT. *Bioinformatics*, 2009, vol. 25, no. 6, pp. 765–771. doi: 10.1093/bioinformatics/btp053

37. Nandakumar A., Uwatoko F., Yamamoto M., Tomita K., Majima H.J., Akiba S., Koriyama C. Radiation-induced Epstein–Barr virus reactivation in gastric cancer cells with latent EBV infection. *Tumor Biol.*, 2017, vol. 39, no. 7: 1010428317717718. doi: 10.1177/1010428317717718
38. Paschos K., Smith P., Anderton E., Middeldorp J.M., White R.E., Allday M.J. Epstein–Barr virus latency in B cells leads to epigenetic repression and CpG methylation of the tumor suppressor gene bim. *PLoS Pathog.*, 2009, vol. 5, no. 6: 1000492. doi: 10.1371/journal.ppat.1000492
39. Portis T., Longnecker R. Epstein–Barr virus (EBV) LMP2A mediates B-lymphocyte survival through constitutive activation of the Ras/PI3K/AKT pathway. *Oncogene*, 2004, vol. 23, no. 53, pp. 8619–8628. doi: 10.1038/sj.onc.1207905
40. Pratt Z.L., Zhang J., Sugden B. Simultaneously induce and inhibit oncogene of Epstein–Barr virus can the latent membrane protein 1 (LMP1) apoptosis in B cells. *J. Virol.*, 2012, vol. 86, no. 8, pp. 4380–4393. doi: 10.1128/JVI.06966-11
41. Schneider F., Neugebauer J., Griese J., Liefold N., Kutz H., Briseño C., Kieser A. The viral oncoprotein LMP1 exploits TRADD for signaling by masking its apoptotic activity. *PLoS Biol.*, 2008, vol. 6, no. 1: 8. doi: 10.1371/journal.pbio.0060008
42. Schröfelbauer B., Polley S., Behar M., Ghosh G., Hoffmann A. NEMO ensures signaling specificity of the pleiotropic IKK β by directing its kinase activity toward I κ B α . *Mol. Cell*, 2012, vol. 47, pp. 111–121. doi: 10.1016/j.molcel.2012.04.020
43. Schwerk C., Schulze-Osthoff K. Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. *Mol. Cell*, 2005, vol. 19, pp. 1–13. doi: 10.1016/j.molcel.2005.05.026
44. Shinozaki-Ushiku A., Kunita A., Isogai M., Hibiya T., Ushiku T., Takada K., Fukayama M. Profiling of virus-encoded microRNAs in Epstein–Barr virus-associated gastric carcinoma and their roles in gastric carcinogenesis. *J. Virol.*, 2015, vol. 89, no. 10, pp. 5581–5591. doi: 10.1128/JVI.03639-14
45. Snow A.L., Lambert S. L., Natkunam Y., Esquivel C.O., Krams S.M., Martinez O.M. EBV can protect latently infected B cell lymphomas from death receptor-induced apoptosis. *J. Immunol.*, 2006, vol. 177, pp. 3283–3293. doi: 10.4049/jimmunol.177.5.3283
46. Solntsev L.A., Starikova V.D., Sakharnov N.A., Knyazev D.I., Utkin O.V. Strategy of probe selection for studying mRNAs that participate in receptor-mediated apoptosis signaling. *Mol. Biol.*, 2015, vol. 49, no. 3, pp. 457–465. doi: 10.7868/S0026898415030167
47. Steelman L.S., Pohnert S.C., Shelton J.G., Franklin R.A., Bertrand F.E., McCubrey J.A. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia*, 2004, vol. 18, no. 2, pp. 189–218. doi: 10.1038/sj.leu.2403241
48. Tepper C.G., Seldin M.F. Modulation of caspase-8 and FLICE-inhibitory protein expression as a potential mechanism of Epstein–Barr virus tumorigenesis in Burkitt’s lymphoma. *Blood*, 1999, vol. 94, no. 5, pp. 1727–1737.
49. Williams E.J., Embleton N.D., Clark J.E., Bythell M., Ward Platt M.P., Berrington J.E. Viral infections: contributions to late fetal death, stillbirth, and infant death. *J. Pediatr.*, 2013, vol. 163, no. 2, pp. 424–428. doi: 10.1016/j.jpeds.2013.02.004
50. Wu Z., Aryee M.J. Subset quantile normalization using negative control features. *J. Comput. Biol.*, 2010, vol. 17, no. 10, pp. 1385–1395. doi: 10.1089/cmb.2010.0049
51. Yachie A. Cytologic analysis of Epstein–Barr virus-associated T/Natural killer-cell lymphoproliferative diseases. *Front. Pediatr.*, 2018, vol. 6: 327. doi: 10.3389/fped.2018.00327
52. Zhu D.M., Shi J., Liu S., Liu Y., Zheng D. HIV infection enhances TRAIL-induced cell death in macrophage by down-regulating decoy receptor expression and generation of reactive oxygen species. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 4: e18291. doi: 10.1371/journal.pone.0018291
53. Zimmer-Strobl U., Strobl L.J. EBNA2 and Notch signaling in Epstein–Barr virus mediated immortalization of B lymphocytes. *Semin. Cancer Biol.*, 2001, vol. 11, no. 6, pp. 423–434. doi: 10.1006/scbi.2001.0409
54. Zuo J., Thomas W.A., Haigh T.A., Fitzsimmons L., Long H.M., Hislop A.D., Taylor G.S., Rowe M. Epstein–Barr virus evades CD4+ T cell responses in lytic cycle through BZLF1-mediated down-regulation of CD74 and the cooperation of vBcl-2. *PLoS Pathog.*, 2011, vol. 7, no. 12: 1002455. doi: 10.1371/journal.ppat.1002455

Авторы:

Сахарнов Н.А., научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

Уткин О.В., к.б.н., зав. лабораторией молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

Филатова Е.Н., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

Князев Д.И., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

Преснякова Н.Б., научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия.

Authors:

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

Utkin O.V., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Filatova E.N., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

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

Presnyakova N.B., Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

Поступила в редакцию 25.12.2018
Отправлена на доработку 21.05.2019
Принята к печати 09.09.2019

Received 25.12.2018
Revision received 21.05.2019
Accepted 09.09.2019