

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ВЭБ- И ВГЧ6-АССОЦИИРОВАННОГО МОНОНУКЛЕОЗА

DOI: 10.17691/stm2019.11.3.01

УДК 616.155.33:578.27:616.988

Поступила 10.01.2019 г.

© **Е.Н. Филатова**, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии¹;
Н.А. Сахарнов, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии¹;
Д.И. Князев, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии¹;
Т.Н. Цыбусова, к.м.н., доцент кафедры факультетской хирургии и трансплантологии²;
О.В. Уткин, к.б.н., ведущий научный сотрудник, зав. лабораторией молекулярной биологии и биотехнологии¹

¹Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии
им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, ул. Грузинская, 44, Н. Новгород, 603950;

²Приволжский исследовательский медицинский университет, пл. Минина и Пожарского, 10/1,
Н. Новгород, 603005

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) и вирус герпеса человека тип 6 (ВГЧ6) являются возбудителями инфекционного мононуклеоза и могут вносить существенный вклад в развитие лимфопролиферативных заболеваний. Эффективные средства терапии инфекции на сегодняшний день не разработаны. В качестве потенциальной терапевтической мишени возможно использование молекулярных маркеров — ключевых транскриптов — участников патогенеза.

Цель исследования — выявление набора молекулярно-генетических маркеров ВЭБ- и ВГЧ6-ассоциированной инфекции в лейкоцитах крови пациентов с инфекционным мононуклеозом.

Материалы и методы. Исследован транскриптом лейкоцитов периферической крови детей и подростков с инфекционным мононуклеозом, вызванным вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ-ИМ) и вирусом герпеса человека тип 6 (ВГЧ6-ИМ), а также здоровых доноров, сопоставимых по полу и возрасту. С помощью разработанных ДНК-биочипов проанализирована экспрессия 403 генов (суммарный уровень представленности всех мРНК одного гена) и 712 транскриптов (индивидуальных сплайсированных вариантов мРНК одного гена), участвующих в регуляции активации, пролиферации и апоптоза иммунокомпетентных клеток. Анализ данных проводили с помощью комбинации методов машинного обучения и традиционной статистики. В качестве молекулярных маркеров инфекции отобраны гены и транскрипты, характеризующиеся максимальной важностью для парной классификации и статистически значимыми изменениями по сравнению с группой здоровых доноров.

Результаты. Выделены уникальные наборы кандидатных маркеров ВЭБ-ИМ и ВГЧ6-ИМ. ВЭБ-ИМ характеризовался снижением экспрессии транскриптов 5 AR и 4 ASCC1, гена CAD и мРНК FADD на фоне повышения экспрессии транскриптов 2 HLA-DPA1 и 4 RIPK1. ВГЧ6-ИМ сопровождался повышением экспрессии мРНК AVEN, транскриптов 2 CHUK, 2 CIRBP и 2 TRAF3, а также снижением экспрессии транскрипта 10 IRAK4. После выздоровления экспрессия большинства маркеров нормализовалась.

Заключение. Наборы выявленных маркеров уникальны в отношении двух изученных инфекций и могут использоваться в качестве мишеней при разработке новых специфических биотерапевтических препаратов.

Ключевые слова: ДНК-биочип; машинное обучение; мРНК; транскрипт; инфекционный мононуклеоз; ВЭБ, ВГЧ6; апоптоз; пролиферация.

Как цитировать: Filatova E.N., Sakharnov N.A., Knyazev D.I., Tsybusova T.N., Utkin O.V. Molecular markers of EBV and HHV6-associated mononucleosis. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2019; 11(3): 7–14, <https://doi.org/10.17691/stm2019.11.3.01>

Для контактов: Филатова Елена Николаевна, e-mail: filatova@nniiem.ru

Molecular Markers of EBV- and HHV6-Associated Mononucleosis

E.N. Filatova, PhD, Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology¹;
N.A. Sakharnov, Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology¹;
D.I. Knyazev, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology¹;
T.N. Tsybusova, MD, PhD, Associate Professor, Department of Advanced Surgery and Transplantology²;
O.V. Utkin, PhD, Leading Researcher, Head of the Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology¹

¹Blokhina Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Nizhny Novgorod,
 Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор),
 44 Gruzinskaya St., Nizhny Novgorod, 603950, Russia;

²Privolzhsky Research Medical University, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia

Epstein–Barr virus (EBV) and human herpesvirus type 6 (HHV6) are causative agents of infectious mononucleosis and can lead to the development of lymphoproliferative diseases. Means of radical therapy for this disease are yet to be found. Key transcripts involved in the pathogenesis can be used as molecular markers and also as potential therapeutic targets.

The aim of the study was to identify molecular markers associated with infection caused by EBV and HHV6; specifically, we looked into the markers localized in blood leukocytes of patients with infectious mononucleosis.

Materials and Methods. We studied the transcriptome of peripheral blood leukocytes in children and adolescents with infectious mononucleosis caused by Epstein–Barr virus (EBV-IM) and human herpesvirus type 6 (HHV6-IM), as well as healthy subjects matched by gender and age. Using our original DNA biochips, we determined the expression of 403 genes (total representation level of all mRNA of one gene) and 712 transcripts (individual spliced mRNA of one gene) essential for the proliferation and apoptosis of immunocompetent cells. Data analysis was performed using a combination of machine learning and traditional statistics. The genes and transcripts which are highly important for paired classification and have the statistically significant differences in the expression between patients and healthy subjects were selected to serve molecular markers of the infection.

Results. Unique groups of candidate markers for EBV-IM and HHV6-IM were identified. EBV-IM was characterized by a decreased expression of the AR transcript 5 and ASCC1 transcript 4 and also of the CAD gene and FADD mRNA; an increased expression of the HLA-DPA1 transcript 2 and RIPK1 transcript 4 were found. In patients with HHV6-IM, an increase in the expression of AVEN mRNA, CHUK transcript 2, CIRBP transcript 2, and TRAF3 transcript 2, as well as a decrease in the expression of IRAK4 transcript 10 was observed. In the post-infection period, the expression levels of most of the markers returned to normal.

Conclusion. The sets of identified markers are uniquely characteristic of the two infections (EBV-IM and HHV6-IM) and can be used as targets for new therapies.

Key words: DNA biochip; machine learning; mRNA; transcript; infectious mononucleosis; EBV; HHV6; apoptosis; proliferation.

Введение

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ, *Human gammaherpesvirus 4*) и вирус герпеса человека тип 6 (ВГЧ6, *Human betaherpesvirus 6*) — представители семейства *Herpesviridae*, являющиеся возбудителями инфекционного мононуклеоза (ИМ). Оба вируса обладают тропностью к широкому спектру субпопуляций иммунокомпетентных клеток, оказывают влияние на их содержание в крови пациентов [1], а также могут вносить существенный вклад в развитие лимфопролиферативных заболеваний [2–4]. На сегодняшний день эффективные таргетные методы терапии не разработаны.

На молекулярном уровне воздействие вирусов реализуется путем модуляции экспрессии генов, участвующих в активации клеток иммунной системы, их пролиферации, дифференцировке и апоптозе. Выраженное изменение экспрессии набора генов, контролирующих указанные процессы, может служить своеобразным

уникальным молекулярным паспортом ВЭБ-ИМ и ВГЧ6-ИМ, а отдельные гены — маркерами инфекции. Такие маркеры можно использовать с целью диагностики и мониторинга заболеваний, а также в качестве потенциальной терапевтической мишени [5–8].

С применением технологии ДНК-биочипов (DNA microarray) можно оценить не только экспрессию гена (суммарный уровень представленности всех его мРНК), но и состав, а также количественное соотношение его транскриптов (сплайсированных вариантов мРНК одного гена). Учитывая оптимальное соотношение стоимости исследования, производительности и точности результатов, ДНК-биочипы часто становятся технологией первого выбора при проведении поисковых работ, целью которых является обнаружение новых молекулярно-генетических маркеров широкого спектра заболеваний [9]. Анализ результатов, полученных с помощью ДНК-биочипов, так же как и с помощью методов высокопроизводительного секвенирования, требует привлечения сложного математического

аппарата, сочетающего методы прикладной статистики и алгоритмы машинного обучения [10].

Целью данной работы стало выявление набора молекулярно-генетических маркеров ВЭБ- и ВГЧ6-ассоциированной инфекции в лейкоцитах крови пациентов с инфекционным мононуклеозом.

Материалы и методы

Дизайн и синтез ДНК-биочипа. Для анализа экспрессии мРНК генов — участников основных клеточных процессов — нами сконструированы ДНК-биочипы. Селекцию дискриминирующих зондов, являющихся функциональной основой биочипа, производили с использованием алгоритма «Splice variants microarray design pipeline» [11]. Всего выбрано 1115 зондов, из которых 403 позволяют оценивать экспрессию генов, а 712 детектируют уровни представленности индивидуальных транскриптов. Полный перечень генов и их транскриптов представлен в дополнительных материалах (см. Приложение 1, https://drive.google.com/file/d/1xKS_MvENloPYKwuzcC1LaqFTN3i130So/view). Также в дизайн ДНК-биочипа включены 70 зондов негативного контроля, подобранных на основе генома бактерии *Rhizobium rubi*. Синтез зондов на биочип осуществляли *in situ* с помощью оборудования V3 Synthesizer и соответствующего комплекта реагентов в соответствии с рекомендациями производителя (CustomArray Inc., США).

Отбор исследуемых групп. В исследовании приняли участие дети и подростки 7–18 лет с диагнозом «острый инфекционный мононуклеоз», а также практически здоровые добровольцы, сопоставимые по полу и возрасту. В крови и сыворотке крови участников определяли наличие специфических антител к ВЭБ, ВГЧ6 и цитомегаловирусу (ЦМВ), а также наличие ДНК этих возбудителей. Использовали коммерческие наборы для иммуноферментной диагностики: «ВектоВЭБ-VCA-IgM», «ВектоВЭБ-VCA-IgG», «ВектоHNV-6-IgG», «ВектоЦМВ-IgM», «ВектоЦМВ-IgG» («Вектор-Бест», Россия) и коммерческий набор для ПЦР в режиме реального времени «АмплиСенс EBV/CMV/HNV6-скрин-FL» (Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Россия).

По результатам обследования были выделены группы: НОРМ — практически здоровые доноры без клинических и лабораторных признаков инфекции (n=17, средний возраст — 11 лет); ВЭБинф — пациенты с ВЭБ-опосредованным ИМ (n=6, средний возраст — 12 лет); ВГЧ6инф — пациенты с ВГЧ6-опосредованным ИМ (n=7, средний возраст — 11 лет). Клинически здоровые добровольцы с лабораторными признаками инфекции, пациенты с ЦМВ-опосредованным ИМ или микст-инфекцией из исследования были исключены.

Забор материала. В качестве материала для исследования использовали образцы периферической крови. Забор крови у пациентов с инфекцией проводили до начала лечения, а также после выздоровления

и исчезновения клинических и лабораторных признаков заболевания (группы ВЭБрек и ВГЧ6рек). Средний срок повторного забора крови составил 2 мес после реконвалесценции.

Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией (2013) и одобрено Этическим комитетом Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора. Забор материала выполняли с информированного согласия родителей или опекунов пациентов.

Подготовка и гибридизация мРНК. Для выделения фракции лейкоцитов использовали раствор «Гемолитик» (Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Россия). С помощью набора «МАГНО-сорб» (Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Россия) из полученных лейкоцитов выделяли пул тотальной РНК, который дополнительно очищали и концентрировали смесью фенола и хлороформа в соотношении 1:1. Тотальная РНК (2 мкг) подвергалась обратной транскрипции и достройке второй цепи с применением набора Mint cDNA synthesis kit («Евроген», Россия), при этом 3'-олиго-Т-праймер заменяли на содержащий Т7 промотор-олиго-Т-праймер («ДНК-синтез», Россия). Достройку второй цепи и амплификацию кДНК проводили в ходе 15 циклов ПЦР по программе: 95°C — 25 с; 60°C — 25 с; 72°C — 6 мин. Полученную двухцепочечную кДНК (2 мкг) транскрибировали с применением Т7 РНК-полимеразы (Thermo Scientific, Англия), добавляя биотиновую метку за счет использования биотинилированных нуклеотидов UTP («ДНК-синтез», Россия). Процедуру транскрипции повторяли трижды.

Полученные в результате синтеза пробы меченых РНК гибридизировали раздельно. Процедуру гибридизации РНК на биочип и считывание амперометрического сигнала выполняли с применением оборудования и реагентов ElectraSense (CustomArray Inc., США) в соответствии с рекомендациями производителя. Полученный сигнал рассматривали как относительный уровень экспрессии гена или транскрипта.

Обработка данных. Обработку данных и расчеты выполняли с применением языка программирования R (версия 3.5.0; R Foundation for Statistical Computing, Австрия) и среды RStudio (версия 1.1.453; RStudio, США). Данные были нормализованы с использованием квантильной нормализации на основе негативного контроля [12]. Затем строили матрицу результатов, в которой строки соответствовали факторам — уровням экспрессии генов и их транскриптов, а колонки — пробам РНК, отнесенным к той или иной группе (НОРМ, ВЭБинф, ВГЧ6инф, ВЭБрек и ВГЧ6рек).

Далее проводили попарный дискриминантный анализ всех пяти групп. Строили модель зависимости принадлежности пробы РНК к одной из двух сравниваемых групп. Использовали алгоритм градиентного бустинга над решающими деревьями. Подбор параметров модели и оценку ее эффективности осуществляли с применением метода кросс-валидации.

Полученный классификатор считали эффективным при значении медианы показателя аккуратности (accuracy) и медианы показателя площади (AUC) под кривой ошибок (area under receiver operating characteristic (ROC) curve) не менее 0,75. В случае построения эффективного классификатора для улучшения качества классификации проводили повторное моделирование, снижая количество факторов. Отбирали по 20 генов или транскриптов, обладающих максимальной важностью (feature importance) для каждой модели, полученной в результате кросс-валидации, исключая дублирование [10]. Далее отобранные показатели использовали для повторной процедуры моделирования, реализуемой аналогично первой.

На следующем этапе проводили сравнение уровня экспрессии каждого гена или транскрипта в группах НОРМ и ВЭБинф, НОРМ и ВГЧбинф, ВЭБинф и ВГЧбинф, НОРМ и ВЭБрек, НОРМ и ВГЧбрек. Применяли Т-тест с поправкой на ожидаемую долю ложных отклонений (false discovery rate, FDR) с расчетом значений q . При $q < 0,05$ различия в экспрессии генов и транскриптов считали статистически значимыми.

Также рассчитывали изменение уровня экспрессии. Для этого в каждой группе определяли среднее значение уровня экспрессии для каждого гена или транскрипта, после чего для каждой пары групп рассчитывали изменение экспрессии (%):

$$(\text{среднее группы } 2 \cdot 100 / \text{среднее группы } 1) - 100.$$

На основании полученных данных о важности генов и транскриптов для повторной классификации, об изменении уровня их экспрессии и статистической значимости этого изменения делали выводы о возможности отнесения фактора к молекулярным маркерам ВЭБ-ИМ или ВГЧ6-ИМ. Среди факторов классификации пары НОРМ–ВЭБинф отбирали гены и транскрипты, удовлетворявшие следующим требованиям: уровень экспрессии маркера в группе ВЭБинф статистически значимо изменялся по сравнению с группой НОРМ; изменение уровня экспрессии маркера и/или его важность для классификации НОРМ–ВЭБинф превышала 75-й процентиль (пороговое значение установлено эмпирически) соответствующего показателя для всех факторов; маркер входил в состав факторов классификации ВГЧбинф–ВЭБинф; маркер отсутствовал среди факторов классификации НОРМ–ВГЧбинф. Отобранные гены или транскрипты считали маркерами ВЭБ-инфекции. Маркеры ВГЧ6-инфекции из факторов классификации НОРМ–ВГЧбинф отбирали аналогично.

Результаты

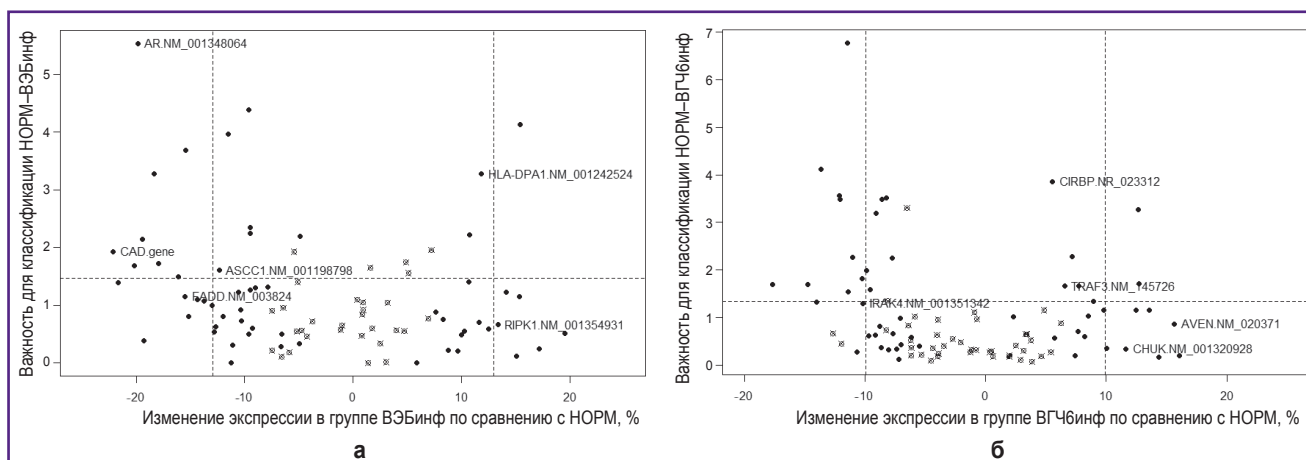
На начальном этапе были построены модели классификации проб мРНК в группах сравнения НОРМ–ВЭБинф, НОРМ–ВГЧбинф и ВГЧбинф–ВЭБинф. При этом сокращение количества факторов позволило улучшить качество моделей при повторной классификации групп НОРМ–ВЭБинф и НОРМ–ВГЧбинф. Для

Т а б л и ц а 1

Характеристика моделей, построенных в ходе дискриминантного анализа проб РНК пациентов с инфекционным мононуклеозом и здоровых доноров

Группы	Классификация 1				Классификация 2			
	Количество факторов	Количество моделей, построенных при кросс-валидации	Аккуратность	Площадь под кривой ошибок	Количество факторов	Количество моделей, построенных при кросс-валидации	Аккуратность	Площадь под кривой ошибок
НОРМ–ВЭБинф	1115	6	0,91 [0,77; 0,98]	0,83 [0,74; 0,96]	81	6	1,0 [0,94; 1,0]	1,0 [0,88; 1,0]
НОРМ–ВГЧбинф	1115	7	0,90 [0,81; 0,90]	0,83 [0,77; 0,93]	87	7	0,90 [0,86; 0,95]	0,88 [0,84; 0,96]
ВГЧбинф–ВЭБинф	1115	6	0,83 [0,71; 0,85]	0,83 [0,71; 0,83]	87	7	0,83 [0,74; 0,85]	0,83 [0,71; 0,83]
ВЭБинф–ВЭБрек	1115	6	0,57 [0,50; 0,67]	0,58 [0,58; 0,67]	Повторную классификацию не проводили			
ВГЧбинф–ВГЧбрек	1115	7	0,50 [0,42; 0,63]	0,58 [0,50; 0,67]	Повторную классификацию не проводили			
НОРМ–ВЭБрек	1115	6	0,73 [0,72; 0,88]	0,68 [0,60; 0,77]	Повторную классификацию не проводили			
НОРМ–ВГЧбрек	1115	7	0,67 [0,62; 0,75]	0,54 [0,43; 0,68]	Повторную классификацию не проводили			

Примечания: для значений аккуратности и площади под кривой ошибок указаны медиана, 25-й и 75-й процентиля. НОРМ — практически здоровые доноры; ВЭБинф — пациенты с острым ВЭБ-мононуклеозом; ВЭБрек — они же после выздоровления; ВГЧбинф — пациенты с острым ВГЧ6-мононуклеозом; ВГЧбрек — они же после выздоровления.



Распределение генов и транскриптов относительно изменения экспрессии и важности для повторной классификации:

а — классификация НОРМ–ВЭБинф; б — классификация НОРМ–ВГЧинф. Сплошными точками обозначены факторы, изменение экспрессии которых статистически значимо ($q < 0,05$), перечеркнутыми — изменение экспрессии статистически не достоверно ($q \geq 0,05$). Пунктирной линией обозначен 75-й процентиль соответствующего показателя. Гены и транскрипты, определенные как специфичные молекулярные маркеры инфекции, подписаны справа от обозначающей точки. НОРМ — практически здоровые доноры; ВЭБинф — пациенты с острым ВЭБ-мононуклеозом; ВГЧинф — пациенты с острым ВГЧ6-мононуклеозом

групп сравнения ВГЧинф–ВЭБинф снижение количества факторов и повторное моделирование улучшило качество классификации незначительно (табл. 1). В среднем количество факторов, используемых для второй классификации, составило менее 8% от исходного набора. Полный перечень генов и транскриптов, уровень которых учитывали при построении второй модели принадлежности проб РНК к группам НОРМ–ВЭБинф, НОРМ–ВГЧинф и ВГЧинф–ВЭБинф, представлен в дополнительных материалах (см. Приложения 2–4, https://drive.google.com/file/d/1xKS_MvENloPYKwuzeC1LaqFTH3i130So/view). Для групп сравнения ВЭБинф–ВЭБрек, ВГЧинф–ВГЧ6рек, НОРМ–ВЭБрек и НОРМ–ВГЧ6рек не удалось построить удовлетворительных моделей принадлежности проб РНК к группам (см. табл. 1).

Далее согласно алгоритму были отобраны уникальные наборы молекулярных маркеров, позволяющих различить ВЭБ-ИМ и ВГЧ6-ИМ (см. рисунок). Для каждого выявленного маркера проанализированы изменения уровня его экспрессии по сравнению с нормой в острую фазу заболевания и в период реконвалесценции (табл. 2). У пациентов с острым ВЭБ-ИМ наблюдалось снижение экспрессии транскриптов 5 AR и 4 ASCC1, мРНК FADD, а также гена CAD по сравнению с нормой. Экспрессия транскриптов 2 HLA-DPA1 и 4 RIPK1, наоборот, повышалась. Реконвалесценция сопровождалась нормализацией всех показателей, за исключением уровней экспрессии гена CAD и транскрипта 4 RIPK1, которые сохранялись измененными. У пациентов с ВГЧ6-ИМ вне зависимости от фазы заболевания экспрессия маркеров ВЭБ-ИМ соответствовала таковой у здоровых доноров. Исключение соста-

вила мРНК FADD, экспрессия которой у пациентов с ВГЧ6-ИМ возрастала.

В острый период ВГЧ6-ИМ обнаружено повышение экспрессии мРНК AVEN, транскриптов 2 CHUK, 2 CIRBP и 2 TRAF3, а также снижение экспрессии транскрипта 10 IRAK4. После выздоровления наблюдали нормализацию всех параметров за исключением уровня экспрессии транскрипта 2 TRAF3, который оставался повышенным. У пациентов с ВЭБ-ИМ экспрессия вышеперечисленных маркеров не изменялась, за исключением транскриптов 2 CIRBP и 10 IRAK4, уровни представленности которых соответственно снижались и повышались в острую фазу инфекции.

Обсуждение

Предложенный нами алгоритм обработки данных гибридизации проб РНК на ДНК-биочип позволяет выявить уникальный набор молекулярных маркеров ВЭБ-ИМ и ВГЧ6-ИМ. Он основан на комбинации методов машинного обучения и традиционной статистики. Такой комбинированный подход позволил решить несколько задач: определить принципиальную возможность отнесения пациента к той или иной группе на основании экспрессии набора генов и индивидуальных транскриптов (задача классификации); сократить количество анализируемых факторов за счет удаления незначимых для анализа элементов (выделение важных для классификации параметров); определить статистически значимые изменения экспрессии каждого из множества генов у пациентов с ВЭБ-ИМ и ВГЧ6-ИМ (задача статистики); выделить уникальный

Таблица 2

Изменение экспрессии генов и транскриптов в лейкоцитах крови пациентов в острую фазу инфекции и после выздоровления

Уникальный набор маркеров	Ген или транскрипт (идентификационный номер NCBI)	Пациенты с ВЭБ		Пациенты с ВГЧ6	
		Изменение экспрессии по сравнению с НОРМ, %		Изменение экспрессии по сравнению с НОРМ, %	
		Острая инфекция	После выздоровления	Острая инфекция	После выздоровления
ВЭБ-ИМ	AR тр. 5 (NM_001348064)	-19,85 q<0,001	-7,68 q=0,196	-0,78 q=0,83	-4,83 q=0,20
	ASCC1 тр. 4 (NM_001198798)	-13,02 q=0,001	-4,43 q=0,381	5,01 q=0,166	1,23 q=0,728
	CAD (Gene ID: 790)	-22,14 q<0,001	-18,44 q=0,026	-9,28 q=0,125	5,26 q=0,588
	FADD мРНК (NM_003824)	-15,51 q<0,001	-4,12 q=0,444	9,88 q=0,024	5,66 q=0,349
	HLA-DPA1 тр. 2 (NM_001242524)	11,86 q<0,001	4,71 q=0,357	1,31 q=0,743	0,14 q=0,963
	RIPK1 тр. 4 (NM_001354931)	13,38 q=0,001	9,26 q=0,033	1,83 q=0,652	0,09 q=0,978
ВГЧ6-ИМ	AVEN мРНК (NM_020371)	8,32 q=0,115	3,91 q=0,219	15,64 q=0,007	1,92 q=0,546
	CHUK тр. 2 (NM_001320928)	-11,25 q=0,178	-10,81 q=0,292	11,62 q=0,007	0,89 q=0,867
	CIRBP тр. 2 НК (NR_023312)	-13,31 q=0,005	-4,0 q=0,389	5,55 q=0,012	8,91 q=0,082
	IRAK4 тр. 10 (NM_001351342)	5,51 q=0,607	0,24 q=0,957	-10,17 q=0,012	4,81 q=0,340
	TRAF3 тр. 2 (NM_145726)	-13,56 q=0,010	4,05 q=0,389	6,56 q=0,007	8,40 q=0,022

Примечания: тр. — транскрипт; мРНК — единственная известная последовательность мРНК гена; НК — некодирующий белок транскрипт.

для каждого заболевания набор маркерных генов и транскриптов (логическое исключение).

В рамках настоящего исследования построены классификаторы, позволяющие дифференцировать практически здоровых лиц, пациентов с ВЭБ-ИМ и с ВГЧ6-ИМ на основании экспрессии изученных генов и транскриптов. Данный факт свидетельствует о существовании различий в молекулярных механизмах патогенеза двух вирусных инфекций. С другой стороны, модели отличий паттернов экспрессии генов и транскриптов группы пациентов после выздоровления от здоровых доноров и детей с острым ИМ построить не удалось. Полученный результат позволяет предположить, что экспрессия набора изученных нами генов и транскриптов после клинического выздоровления не нормализуется, по крайней мере в течение двух месяцев, сохраняя «молекулярный след» инфекции. Данный вывод подтверждается фактом изменения относительно нормы экспрессии некоторых маркеров ВЭБ-ИМ и ВГЧ6-ИМ и после выздоровления

(см. табл. 2). Таким образом, ВЭБ и ВГЧ6 способны оказывать пролонгированное влияние на иммунную систему пациента, регулируя экспрессию генов и транскриптов, участвующих в апоптозе, пролиферации и других фундаментальных процессах, которые реализуются в иммунокомпетентных клетках.

С использованием предложенного алгоритма нами определены уникальные наборы молекулярных маркеров ВЭБ- и ВГЧ6-ассоциированного мононуклеоза. Преобладающее большинство кандидатных маркеров являются сплайсированными вариантами мРНК генов, принадлежащих к разным функциональным группам. Часть транскриптов представляют собой единственный известный либо «основной» вариант мРНК одного гена (мРНК FADD, мРНК AVEN). Как правило, функция белков, кодируемых такими транскриптами, в литературе описывается как свойство самого гена. Другие транскрипты кодируют структурно-функциональные формы белка, отличные от «основного» варианта, но проявляющие схожие свойства (транскрипты 5 AR,

2 CHUK и 10 IRAK4). Третью группу формируют сплайсированные варианты мРНК гена, отличающиеся от «основной» формы нуклеотидными последовательностями в 5'-НТР (транскрипты 2 HLA-DPA1 и 4 RIPK1). Белковый продукт таких транскриптов аналогичен продукту «основного» сплайсированного варианта мРНК. При этом стабильность самих транскриптов и активность их трансляции могут отличаться вследствие различий нуклеотидного состава в регуляторных областях мРНК. Особый интерес представляют транскрипты, продукты трансляции которых имеют функцию, отличающуюся от таковой у «основного» варианта мРНК или прямо противоположную ему. Среди выявленных нами маркеров к этой группе относится транскрипт 4 ASCC1, кодирующий белок, который, в отличие от «основной» формы, не способен ингибировать экспрессию NF-κB и NF-κB-таргетных генов [13]. Другой пример — транскрипт 2 ингибитора NF-κB-киназ TRAF3, продукт которого индуцирует экспрессию NF-κB в активированных Т-клетках [14].

Помимо белок-кодирующих транскриптов в качестве маркера ВГЧ6-инфекции нами определен некодирующий транскрипт 2 регулятора клеточного цикла и индуктора апоптоза CIRBP. Функциональное значение не транслирующего белок транскрипта хорошо объяснено в рамках концепции непродуктивного сплайсинга — альтернативного сплайсинга, приводящего к образованию некодирующих транскриптов таргетного гена и их последующей деградации. Изменение соотношения кодирующих и некодирующих транскриптов определяет уровень экспрессии белкового продукта целевого гена [15]. Описанный механизм регуляции генной экспрессии за счет альтернативного сплайсинга может быть расширен и на кодирующие белок варианты мРНК: увеличение доли одного транскрипта приводит к уменьшению доли других транскриптов одного гена и наоборот.

Таким образом, использование транскриптов в качестве маркеров инфекционного заболевания не только оправдано, но и перспективно с точки зрения расширения диагностических и прогностических возможностей биомедицины. Некоторые транскрипты одного гена могут иметь различную клиническую информативность. Так, по нашим данным, снижение экспрессии транскрипта 4 ASCC1 специфично только для ВЭБ-ИМ, в то время как изменение экспрессии транскрипта 1 ASCC1 обнаружено как при ВЭБ-ИМ, так и при ВГЧ6-ИМ (см. Приложение 2, 3, https://drive.google.com/file/d/1xKS_MvENloPYKwuzc1LaqFTH3i130So/view). При этом большинство используемых в настоящее время диагностических тест-систем определяют экспрессию гена или содержание белка, но не позволяют оценивать соотношение индивидуальных транскриптов.

Полученные нами результаты говорят об активации различных молекулярных механизмов регуляции пролиферации и апоптоза клеток в лейкоцитах крови пациентов с ВЭБ-ИМ и ВГЧ6-ИМ. Развитие ВЭБ-инфекции сопровождалось снижением экспрессии промоторов пролиферации транскрипта 5 рецепто-

ра стероидных гормонов AR, транскрипта 4 ASCC1 и гена CAD. С другой стороны, при ВЭБ-ИМ также наблюдалось снижение экспрессии мРНК адаптерной молекулы FADD, играющей ключевую роль в цитотоксическом иммунном ответе и апоптозе, и повышение экспрессии транскрипта 4 RIPK1. Киназа RIPK1 является полифункциональным белком, входящим в состав сигнальных путей некроптоза, воспаления и активации NF-κB. Интересно отметить, что реализация некроптоза требует формирования крупного сигнального комплекса, в состав которого в эквимольных количествах входят RIPK1, FADD, каспаза-8 и другие белки [16]. Таким образом, выявленное усиление экспрессии транскрипта 4 RIPK1 при ВЭБ-инфекции на фоне снижения экспрессии FADD может ингибировать апоптоз клетки и способствовать ее выживанию и пролиферации. Кроме того, обнаружено повышение экспрессии транскрипта 2 HLA-DPA1, который не только играет важную роль в презентации антигена, но и служит корецептором, облегчая проникновение ВЭБ в В-лимфоциты [17].

Функциональная роль маркеров ВГЧ6-инфекции преимущественно сводится к активации транскрипции и подавлению апоптоза в клетках. Так, обнаружено повышение экспрессии активаторов NF-κB транскрипта 2 TRAF3 и транскрипта 2 CHUK на фоне роста уровня экспрессии мРНК ингибитора митохондриального пути апоптоза AVEN. Экспрессия некодирующего транскрипта 2 проапоптотического фактора CIRBP повышалась, что также свидетельствует о снижении апоптотической активности в клетках. Кроме того, отметим снижение экспрессии важного медиатора врожденного иммунного ответа транскрипта 10 IRAK4.

Выявленные уникальные наборы молекулярных маркеров ВЭБ- и ВГЧ6-инфекционного мононуклеоза могут быть использованы в качестве терапевтических мишеней при разработке средств современной биотерапии. Важно отметить, что предложенный нами алгоритм может применяться для поиска уникальных маркеров патогенеза других инфекционных заболеваний.

Заключение

В лейкоцитах крови детей и подростков с ВЭБ и ВГЧ6, ассоциированными с мононуклеозом, выявлено изменение экспрессии некоторых генов и транскриптов, регулирующих активацию, пролиферацию и апоптоз иммунокомпетентных клеток. По сравнению с нормой в лейкоцитах пациентов с ВЭБ-инфекцией выявлено снижение экспрессии транскриптов 5 AR и 4 ASCC1, гена CAD и мРНК FADD на фоне повышения экспрессии транскриптов 2 HLA-DPA1 и 4 RIPK1. У пациентов с ВГЧ6-ИМ обнаружено повышение экспрессии мРНК AVEN, транскриптов 2 CHUK, 2 CIRBP и 2 TRAF3, а также снижение экспрессии транскрипта 10 IRAK4. Выявленные маркеры являются важными участниками патогенеза ВЭБ-ИМ и ВГЧ6-ИМ и отражают специфические черты его молекулярных

механизмов, а также иммунного ответа на инфекцию. Наборы выявленных маркеров уникальны для двух исследованных инфекций.

Финансирование исследования. Работа выполнена по государственному заданию №АААА-А16-116040810135-4.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Филатова Е.Н., Солнцев Л.А., Преснякова Н.Б., Кулова Е.А., Уткин О.В. Определение некоторых иммунологических особенностей ВГЧ-6-опосредованного инфекционного мононуклеоза у детей методом дискриминантного анализа. *Инфекция и иммунитет* 2018; 8(2): 223–229. Filatova E.N., Solntsev L.A., Presnyakova N.B., Kulova E.A., Utkin O.V. Determination of some immunological features of hhv-6-mediated infectious mononucleosis in children by the method of discriminatory analysis. *Infektsiya i immunitet* 2018; 8(2): 223–229, <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2018-2-223-229>.
2. Dojcinov S., Fend F., Quintanilla-Martinez L. EBV-positive lymphoproliferations of B- T- and NK-cell derivation in non-immunocompromised hosts. *Pathogens* 2018; 7(1): 28, <https://doi.org/10.3390/pathogens7010028>.
3. Nakayama-Ichihama S., Yokote T., Oka S., Iwaki K., Kobayashi K., Hirata Y., Hiraoka N., Takayama A., Akioka T., Miyoshi T., Takubo T., Tsuji M., Hanafusa T. Diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified, associated with coinfection of human herpesvirus 6 and 8. *J Clin Oncol* 2011; 29(21): e636–e637, <https://doi.org/10.1200/jco.2011.35.1254>.
4. Razzaque A. Oncogenic potential of human herpesvirus-6 DNA. *Oncogene* 1990; 5(9): 1365–1370.
5. Li B., Zeng Q. Personalized identification of differentially expressed pathways in pediatric sepsis. *Mol Med Rep* 2017; 16(4): 5085–5090, <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7217>.
6. Omar M., Klawonn F., Brand S., Stiesch M., Krettek C., Eberhard J. Transcriptome-wide high-density microarray analysis reveals differential gene transcription in periprosthetic tissue from hips with chronic periprosthetic joint infection vs aseptic loosening. *J Arthroplasty* 2017; 32(1): 2342–2340, <https://doi.org/10.1016/j.arth.2016.06.036>.
7. Sano D., Tazawa M., Inaba M., Kadoya S., Watanabe R., Miura T., Kitajima M., Okabe S. Selection of cellular genetic markers for the detection of infectious poliovirus. *J Appl Microbiol* 2018; 124(4): 1001–107, <https://doi.org/10.1111/jam.13621>.
8. Scicluna B.P., van Vught L.A., Zwinderman A.H., Wiewel M.A., Davenport E.E., Burnham K.L., Nürnberg P., Schultz M.J., Horn J., Cremer O.L., Bonten M.J., Hinds C.J., Wong H.R., Knight J.C., van der Poll T.; MARS consortium. Classification of patients with sepsis according to blood genomic endotype: a prospective cohort study. *Lancet Respir Med* 2017; 5(10): 816–826, [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(17\)30294-1](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(17)30294-1).
9. 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 (review). *Sovremennye tehnologii v medicine* 2015; 7(4): 162–173, <https://doi.org/10.17691/stm2015.7.4.23>.
10. Pirooznia M., Yang J.Y., Yang M.Q., Deng Y. A comparative study of different machine learning methods on microarray gene expression data. *BMC Genomics* 2008; 9(Suppl 1): S13, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-s1-s13>.
11. 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; 49(3): 457–465, <https://doi.org/10.1134/s0026893315030164>.
12. Wu Z., Aryee M.J. Subset quantile normalization using negative control features. *J Comput Biol* 2010; 17(10): 1385–1395, <https://doi.org/10.1089/cmb.2010.0049>.
13. Torices S., Alvarez-Rodríguez L., Grande L., Varela I., Muñoz P., Pascual D., Balsa A., López-Hoyos M., Martínez-Taboada V., Fernández-Luna J.L. A truncated variant of ASCC1, a novel inhibitor of NF- κ B, is associated with disease severity in patients with rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2015; 195(11): 5415–5420, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501532>.
14. Michel M., Wilhelmi I., Schultz A.-S., Preussner M., Heyd F. Activation-induced tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 (Traf3) alternative splicing controls the noncanonical nuclear factor κ B pathway and chemokine expression in human T cells. *J Biol Chem* 2014; 289(19): 13651–13660, <https://doi.org/10.1074/jbc.m113.526269>.
15. Filatova E.N., Utkin O.V. The role of noncoding mRNA isoforms in the regulation of gene expression. *Russ J Genet* 2018; 54(8): 879–887, <https://doi.org/10.1134/s1022795418080057>.
16. Feoktistova M., Leverkus M. Programmed necrosis and necroptosis signalling. *FEBS J* 2014; 282(1): 19–31, <https://doi.org/10.1111/febs.13120>.
17. Haan K.M., Kwok W.W., Longnecker R., Speck P. Epstein-Barr virus entry utilizing HLA-DP or HLA-DQ as a coreceptor. *J Virol* 2000; 74(5): 2451–2454, <https://doi.org/10.1128/jvi.74.5.2451-2454.2000>.