

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ТЯЖЕЛОЙ ФОРМЫ ТЕЧЕНИЯ ВЭБ-МОНОНУКЛЕОЗА

Е.Н. Филатова<sup>1</sup>, Н.А. Сахарнов<sup>1</sup>, О.В. Уткин<sup>1</sup>, Е.А. Кулова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

**Резюме.** Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) является одним из этиологических агентов инфекционного мононуклеоза. Тяжелая форма течения заболевания может приводить к развитию серьезных осложнений, риск возникновения которых зависит в том числе от состояния иммунной системы пациента. На сегодняшний день отсутствуют специфические тесты, позволяющие определять риск развития тяжелой формы болезни. Целью работы стало выявление молекулярно-генетических маркеров тяжелой формы течения ВЭБ-инфекционного мононуклеоза (ВЭБ-ИМ) в иммунокомпетентных клетках периферической крови. В лейкоцитах периферической крови пациентов с ВЭБ-ИМ тяжелой и средней степени тяжести, а также практически здоровых доноров определяли экспрессию 483 генов и транскриптов генов, регулирующих апоптоз, пролиферацию и дифференцировку иммунокомпетентных клеток. Использовали ДНК-биочипы оригинального дизайна. Обработку результатов осуществляли с применением разработанной нами программы «MiDA». Для выявления маркеров тяжелой формы течения патологии проводили сравнение экспрессии каждого гена и транскрипта у пациентов с ВЭБ-ИМ и практически здоровых доноров. Для каждого гена и транскрипта определяли уровень изменения экспрессии и значимость для бинарной классификации. В качестве маркеров тяжелой формы ВЭБ-ИМ отбирали гены и транскрипты, характеризовавшиеся максимальными значениями двух определяемых параметров при сравнении пациентов с тяжелой формой инфекции и здоровых доноров, а также пациентов с тяжелой и средней степенью тяжести ВЭБ-ИМ. Гены и транскрипты, экспрессия которых различалась у пациентов с ВЭБ-ИМ средней степени тяжести и здоровых доноров, из перечня маркеров исключались. Также были исключены маркеры, дифференциально экспрессирующиеся в зависимости от пола и возраста обследуемых. В перечень маркеров тяжелой формы течения ВЭБ-ИМ вошли регуляторы апоптоза (гены *BCL2L11*, *BIRC3* и транскрипт *XIAP.NM\_001167*), а также факторы сплайсинга (ген *CELF6* и транскрипт *SF1.NM\_201995*). По сравнению с донорами и пациентами со средней степенью тяжести заболевания, у пациентов с тяжелой формой течения ВЭБ-ИМ в крови выявлено снижение экспрессии генов *BCL2L11*, *BIRC3*, транскриптов *SF1.NM\_201995* и *XIAP.NM\_001167*, а также усиление экспрессии гена *CELF6*. Функциональная роль установленных молекулярных маркеров позволяет предположить, что тяжелая форма ВЭБ-ИМ характеризуется подавлением митохондриального и активацией TRAF-зависимого путей апоптоза в иммунокомпетентных клетках пациентов. Характер экспрессии выделенных маркеров является специфич-

---

**Адрес для переписки:**

Филатова Елена Николаевна  
603950, Россия, г. Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71,  
ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии  
им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора.  
Тел.: 8 (831) 469-79-46 (служебн.). Факс: 8 (831) 469-79-20.  
E-mail: [filatova@nniem.ru](mailto:filatova@nniem.ru)

**Contacts:**

Elena N. Filatova  
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod,  
Malaya Yamskaya str., 71, Blokhina Research Institute  
of Epidemiology and Microbiology.  
Phone: +7 (831) 469-79-46 (office). Fax: +7 (831) 469-79-20.  
E-mail: [filatova@nniem.ru](mailto:filatova@nniem.ru)

**Библиографическое описание:**

Филатова Е.Н., Сахарнов Н.А., Уткин О.В., Кулова Е.А. Определение молекулярно-генетических маркеров тяжелой формы течения ВЭБ-мононуклеоза // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 4. С. 707–716. doi: 10.15789/2220-7619-DMA-1271

**Citation:**

Filatova E.N., Sakharnov N.A., Utkin O.V., Kulova E.A. Determining molecular and genetic markers for severe EBV-mononucleosis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 4, pp. 707–716. doi: 10.15789/2220-7619-DMA-1271

ческим для тяжелой формы течения ВЭБ-ИМ, не зависит от пола и возраста пациентов. Результаты работы могут быть использованы при разработке специфических средств оценки риска развития осложнений ВЭБ-мононуклеоза.

**Ключевые слова:** вирус Эпштейна–Барр, инфекционный мононуклеоз, тяжелое течение, осложнение, экспрессия генов, апоптоз, сплайсинг, ДНК-биочип.

## DETERMINING MOLECULAR AND GENETIC MARKERS FOR SEVERE EBV-MONONUCLEOSIS

Filatova E.N.<sup>a</sup>, Sakharnov N.A.<sup>a</sup>, Utkin O.V.<sup>a</sup>, Kulova E.A.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation*

<sup>b</sup> *Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation*

**Abstract.** Epstein–Barr virus (EBV) is one of the etiological agents causing infectious mononucleosis. A severe form of the disease can result in developing serious complications, which risk might also depend on the state of patient's immune system. To date, no specific tests for assessing a risk of developing severe disease form are available. Our study was aimed at identifying molecular genetic markers of severe EBV-infectious mononucleosis (EBV-IM) in immunocompetent peripheral blood cells. Expression of 483 genes and gene transcripts regulating apoptosis, proliferation and differentiation of immunocompetent cells was measured in the peripheral blood leukocytes from patients with severe and moderate EBV-IM as well as apparently healthy donors. A DNA-microarray designed by us and subsequent data processing were carried out by using custom-made "MiDA" software. To identify markers of a severe form of the pathology, expression of each gene and transcript was compared in EBV-IM patients and apparently healthy donors. For each gene and transcript, the level of expression fold change and significance for binary classification were determined. Genes and transcripts, characterized by the maximum values of two determined parameters while comparing patients with severe infection and healthy donors, as well as patients with severe and moderate EBV-IM forms, were selected as markers of severe EBV-IM. Genes and transcripts with differed expression in patients with moderate EBV-IM and healthy donors, were excluded from the list of markers. In addition, sex- and age-linked markers with differed expression were excluded as well. The markers for severe EBV-IM consisted of apoptosis regulators (BCL2L11, BIRC3 genes and XIAP.NM\_001167 transcript) and splicing factors (CELF6 gene and SF1.NM\_201995 transcript). Compared with donors and patients with a moderate form of the disease, a decreased expression of BCL2L11, BIRC3 genes, transcripts SF1.NM\_201995 and XIAP.NM\_001167, as well as increased expression of the CELF6 gene were detected in the blood of patients with severe EBV-IM. The functional role of identified molecular markers suggests that severe EBV-IM is characterized by suppressed mitochondrial and activated TRAF-dependent apoptosis pathways in immunocompetent cells. The expression pattern for select markers is specific for severe EBV-IM, not associated with patient sex and age. Thus, study data may be used to develop specific tools for assessing a risk of developing complications of EBV mononucleosis.

**Key words:** Epstein–Barr virus, infectious mononucleosis, severe form, complication, gene expression, apoptosis, splicing, DNA-microarray.

## Введение

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ, вирус герпеса 4 типа) — ДНК-содержащий лимфопролиферативный вирус из семейства *Herpesviridae*. ВЭБ обладает высокой тропностью к В- и Т-лимфоцитам, поражает клетки эпителия рото- и носоглотки, канальцев слюнных желез и тимуса. Вирус повсеместно распространен. По различным данным его носителями являются 90–99% взрослого населения, при этом первичное инфицирование чаще всего происходит в детском и подростковом возрасте. В 25–75% случаев ВЭБ-инфекция сопровождается развитием симптомокомплекса инфекционного мононуклеоза различной степени тяжести. Тяжелая форма течения ВЭБ-инфекционного мононуклеоза (ВЭБ-ИМ) может приводить к развитию хронической активной ВЭБ-инфекции и возникновению осложнений, в частности аутоиммунных и зло-

качественных лимфопролиферативных заболеваний [9, 14]. Риск развития тяжелой формы ВЭБ-ИМ зависит от многих факторов, включая индивидуальные особенности пациента: иммунный статус, генетическую предрасположенность, возраст [13, 21].

На сегодняшний день тяжесть течения ВЭБ-ИМ определяют по результатам неспецифических лабораторных тестов, степени выраженности клинических симптомов, длительности их сохранения, развитию осложнений и сопутствующих заболеваний. Молекулярные механизмы возникновения тяжелой формы ВЭБ-ИМ до конца не изучены, а специфические тесты, позволяющие превентивно оценить риск ее возникновения, отсутствуют. Известно, что тяжелое течение заболевания сопровождается развитием выраженного лимфопролиферативного синдрома, возникающего вследствие дисбаланса в системе «пролиферация–апоптоз», нарушением механизмов Т- и НК-клеточного

иммунного ответа, развитием неконтролируемых цитотоксических и воспалительных реакций [10, 21]. В связи с этим с целью поиска молекулярно-генетических маркеров риска развития тяжелой формы ВЭБ-ИМ представляется целесообразным оценивать экспрессию генов, регулирующих апоптоз, пролиферацию и дифференцировку иммунокомпетентных клеток.

Цель работы — поиск новых молекулярно-генетических маркеров тяжелой формы течения ВЭБ-инфекционного мононуклеоза.

## Материалы и методы

**Группы исследования.** В исследование вошли дети и подростки 6–17 лет с диагнозом «острый инфекционный мононуклеоз». С помощью коммерческих тест-систем в образцах сыворотки крови пациентов определяли наличие специфических антител к ВЭБ, герпесвирусу человека 6 типа и цитомегаловирусу (тест-системы «ВектоВЭБ-VCA-IgM», «ВектоВЭБ-VCA-IgG», «ВектоННВ-6-IgG», «ВектоЦМВ-IgM», «ВектоЦМВ-IgG» производства «Вектор-Бест», Россия). В образцах крови участников определяли наличие ДНК вирусов с применением коммерческого набора для ПЦР в реальном времени «АмплиСенс EBV/CMV/ННВ6-скрин-FL» (ЦНИИЭ, Россия). На основании результатов тестирования для исследования отбирали пациентов с инфекционным мононуклеозом, образцы которых содержали антитела и ДНК к ВЭБ, но не к двум другим герпесвирусам. Далее, исходя из клинических симптомов, участников разделяли на две группы: группу пациентов с острым ВЭБ-ИМ средней степени тяжести (ВЭБ-ОС, n = 9, средний возраст 13 лет) и группу пациентов с острой тяжелой формой ВЭБ-ИМ (ВЭБ-ОТ, n = 18, средний возраст 11 лет). Критериями для включения в группы стали следующие показатели: повышение уровня трансаминаз АсАт и АлАт (в 1–3 раза для ВЭБ-ОС и 3–6 раз для ВЭБ-ОТ по сравнению с донорами), содержание в крови атипичных мононуклеарных клеток (10–20% и более 20% соответственно), размер подмышечных, околоушных и заднешейных лимфатических узлов (1,5–2,5 и 2,6–6,0 см соответственно для каждой группы исследования). В качестве материала для исследования использовали образцы периферической крови, которые забирали до начала лечения и после реконвалесценции, подтвержденной отсутствием клинических и лабораторных признаков заболевания (группы ВЭБ-РС и ВЭБ-РТ). Средний срок повторного забора крови составлял 2 месяца после реконвалесценции. Для формирования группы сравнения использовали образцы периферической крови, полу-

ченные от практически здоровых доноров сопоставимого возраста и пола (группа НОРМ, n = 50, средний возраст 11 лет). Забор материала выполняли после получения информированного согласия родителей или опекунов в соответствии с Хельсинской декларацией.

**Пробоподготовка и гибридизация РНК.** Для исследования транскриптома иммунокомпетентных клеток использовали лейкоцитарную фракцию периферической крови, выделенную с применением раствора «Гемолитик» (ЦНИИЭ, Россия). Пул тотальной РНК выделяли с помощью набора «МАГНО-сорб» (ЦНИИЭ, Россия) и концентрировали смесью фенола и хлороформа в соотношении 1:1 в кислой среде. С применением набора «Mint cDNA synthesis kit» (Евроген, Россия) проводили обратную транскрипцию тотальной РНК, при этом 3'-олиго-Т-праймер заменяли на содержащий Т7 промотор-олиго-Т-праймер (ДНК-синтез, Россия). Далее производили достройку второй цепи и амплификацию кДНК. Полученную кДНК транскрибировали с использованием Т7 РНК-полимеразы (Thermo Scientific, ЕС), при этом добавляли биотинилированные УТФ (ДНК-синтез, Россия). Для стандартизации количества исследуемого материала на этапах обратной транскрипции РНК и транскрипции кДНК использовали по 2 мкг матрицы.

Полученную меченую РНК в количестве 2 мкг гибридизовали на ДНК-биочип собственного дизайна, выполненного на базовой платформе «CustomArray Inc.» (США), содержащий набор зондов, селекцию которых осуществляли согласно описанному ранее алгоритму [1]. Суммарно биочип включал 483 зонда, комплементарных последовательностям 147 генов (совокупности транскриптов — сплайсинговых вариантов мРНК одного гена) и 336 индивидуальных транскриптов генов, регулирующих апоптоз, пролиферацию и дифференцировку иммунокомпетентных клеток. Полный перечень детектируемых генов и транскриптов представлен в таблице 1 дополнительных материалов (доступ по ссылке <https://cloud.nniem.ru/s/KY6gDhCXFxpAKk>). Считывание сигнала гибридизации целевой РНК на соответствующий зонд биочипа производили амперометрическим способом с применением устройства и программного обеспечения «ElectraSense» (CustomArray Inc., США). Полученный сигнал рассматривали как относительный уровень экспрессии гена или транскрипта.

**Обработка данных.** Обработку полученных данных выполняли в программной среде R с применением пакета «MiDA» (размещен в официальном репозитории «The Comprehensive R Archive Network», доступ по ссылке <https://CRAN.R-project.org/package=MiDA>). На пред-

варительном этапе проводили вычитание фонового шума и квантильную нормализацию. Для разведывательной оценки данных производили факторный анализ методом главных компонент. При этом в качестве возможных группирующих переменных рассматривали состояние участников (здоровые доноры, пациенты с острой формой инфекции и реконвалесценты), тяжесть течения инфекции, пол и возраст.

Для определения маркеров тяжелой формы течения ВЭБ-ИМ сравнивали уровень экспрессии каждого гена или транскрипта между группой НОРМ и каждой экспериментальной группой попарно. Для выявления различий в уровнях экспрессии использовали Т-тест с поправкой на множественные сравнения (False Discovery Rate), при значении  $q < 0,05$  различия считали статистически значимыми. Рассчитывали кратность изменения экспрессии (Fold Change, FC) как логарифм соотношения средних значений уровня экспрессии гена или транскрипта в каждой экспериментальной группе и группе НОРМ по основанию 2:

$$FC = \log_2(\text{среднее экспериментальной группы} / \text{среднее группы НОРМ}).$$

Для групп сравнения ВЭБ-ОТ — НОРМ, ВЭБ-ОС — НОРМ и ВЭБ-ОТ — ВЭБ-ОС производили попарный дискриминантный анализ, строя классификационную модель. Использовали алгоритм градиентного бустинга над решающими деревьями с применением кросс-валидации. Модель считали эффективной при среднем значении площади под кривой ошибок (AUC) не менее 0,75. При построении эффективного классификатора рассчитывали средний показатель важности каждого гена или транскрипта для классификации (Feature Importance, FI).

Отбор генов и транскриптов производили с учетом параметров FC и FI. То есть для каждой пары групп ВЭБ-ОТ — НОРМ, ВЭБ-ОС — НОРМ и ВЭБ-ОТ — ВЭБ-ОС выделяли кандидатные дискриминирующие маркеры с максимальным значением FC и/или FI. Для определения маркеров тяжелой формы течения ВЭБ-ИМ проводили логическое исключение: отбирали гены и транскрипты, вошедшие в перечень кандидатных маркеров для групп ВЭБ-ОТ — НОРМ и ВЭБ-ОТ — ВЭБ-ОС, но не вошедшие в перечень кандидатных маркеров для групп ВЭБ-ОС — НОРМ.

## Результаты

*Разведывательный анализ данных.* Нами проведен разведывательный анализ данных об уровнях экспрессии генов и транскриптов в лейкоцитах крови пациентов с ВЭБ-моноклеозом и практически здоровых доно-

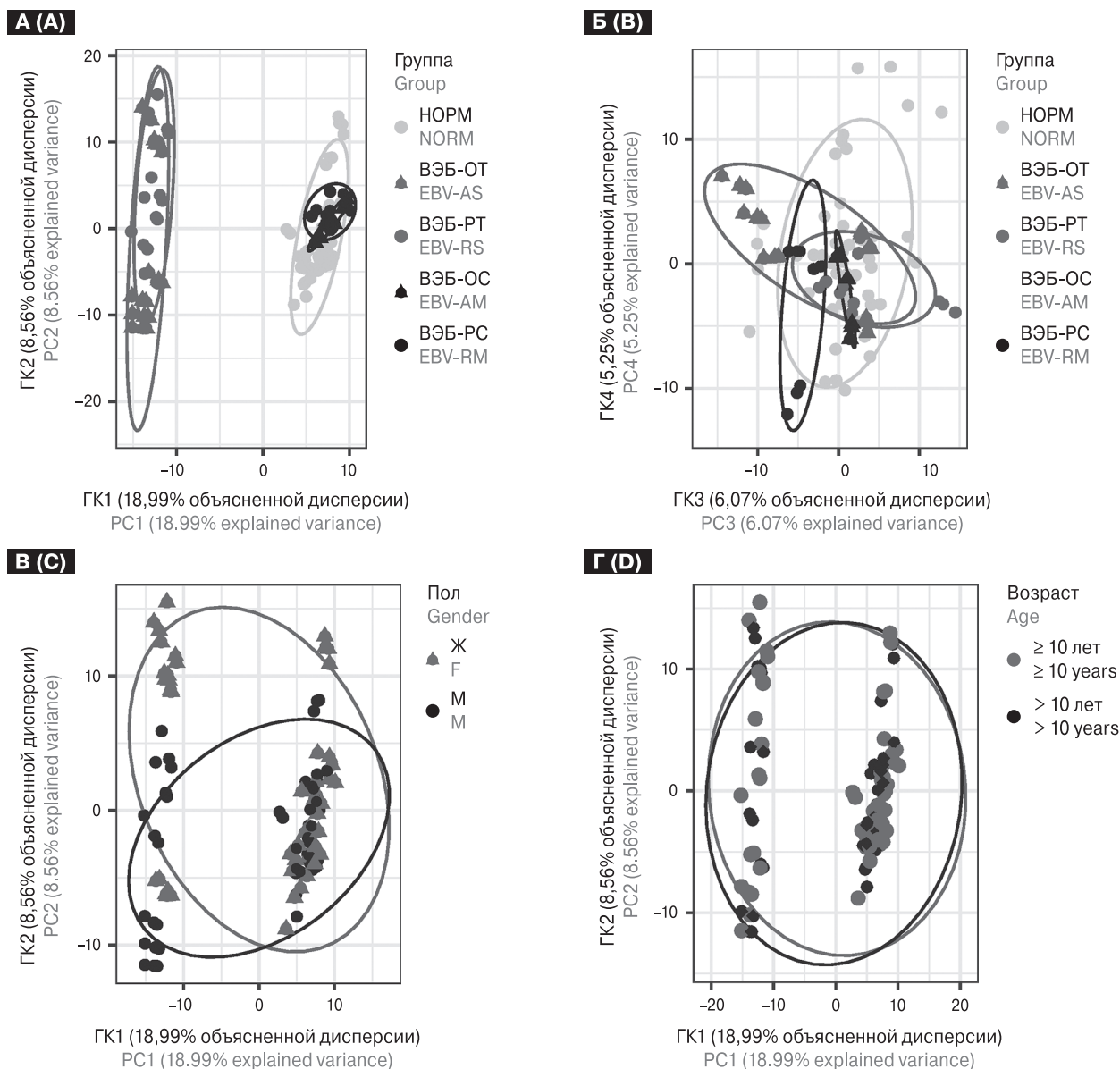
ров. В результате анализа методом главных компонент было выделено 56 компонент, обладающих собственным значением более 1. Суммарно компоненты объясняли 98,41% исходной дисперсии. Визуализация образцов в координатах двух первых компонент показала, что разделение образцов может быть обусловлено формой течения заболевания (первая компонента), а для пациентов с тяжелой формой ВЭБ-ИМ также полом участников (вторая компонента, рис. 1А, В). Расхождение образцов в зависимости от стадии заболевания — острая инфекция или реконвалесценция — выявлено при анализе в координатах третьей компоненты (рис. 1Б), при этом разделение было более выражено у пациентов с ВЭБ-ИМ средней степени тяжести. Расхождения образцов в зависимости от возраста участников обнаружено не было (рис. 1Г).

*Выявление маркеров тяжелой формы течения ВЭБ-инфекции.* На данном этапе работы проведен анализ уровня экспрессии генов и транскриптов в исследуемых группах по сравнению с донорами. Также построены модели классификации для групп сравнения ВЭБ-ОТ — НОРМ, ВЭБ-ОС — НОРМ и ВЭБ-ОТ — ВЭБ-ОС (по 10 моделей для каждой пары групп). Для моделей классификации ВЭБ-ОТ — НОРМ средний показатель AUC составил  $0,97 \pm 0,11$ , для моделей классификации ВЭБ-ОС — НОРМ —  $0,99 \pm 0,02$ , для моделей классификации ВЭБ-ОТ — ВЭБ-ОС —  $1,00 \pm 0,00$ .

В результате анализа нами выделены кандидатные маркеры, позволяющие дифференцировать образцы в трех парах групп. Для групп сравнения ВЭБ-ОТ — НОРМ в перечень таких маркеров вошли гены BCL2L1, BCL2L11, BIRC3, BNIP1, CELF6, ELK1, FASTK, FOSB, HAX1, HNRNPH3, PCNA, PRKCZ, SNRBP и TRAP1, а также транскрипты BCL2.NM\_000633, KHDRBS2.NM\_152688, NOL3.NM\_001276307, SF1.NM\_201995, TNFRSF10C.NM\_003841 и XIAP.NM\_001167. Перечень кандидатных маркеров для групп сравнения ВЭБ-ОС — НОРМ составили ген RFFL и транскрипты VMF.NM\_033503, DFFB.NM\_004402, ELK3.NM\_005230, FASTK.NM\_033015, FPGS.NM\_001018078, HNRNPH1.NM\_001257293, NSMAF.NM\_001144772, PCNA.NM\_002592, PPIB.NM\_000942, PRKCH.NM\_006255, RFFL.ALL и XIAP.NR\_037916. Для групп сравнения ВЭБ-ОТ — ВЭБ-ОС кандидатными маркерами стали гены AIFM1, BCL2L1, BCL2L11, BIRC3, CELF6, ELK1, FPGS, KRAS, NAIP, SNRBP, USP19 и транскрипты AR.NM\_001011645, BBC3.NM\_001127242, CASP1.NM\_033294, FPGS.NM\_001018078, PCNA.NM\_002592, SF1.NM\_201995 и XIAP.NM\_001167.

После проведения процедуры логического исключения были отобраны гены и тран-





**Рисунок. Разведывательный анализ данных методом главных компонент**

Figure. Initial data analysis using principal components

А) Расположение образцов в координатах первой и второй главных компонент с оптическим наложением групп исследования. На рисунке отображены эллипсы нормального распределения образцов для каждой группы. Б) Расположение образцов в координатах третьей и четвертой главных компонент с оптическим наложением принадлежности к группе исследования. В) Расположение образцов в координатах первой и второй главных компонент с оптическим наложением пола участников исследования. Г) Расположение образцов в координатах первой и второй главных компонент с оптическим наложением возраста участников. ВЭБ-ОТ, ВЭБ-РТ — ВЭБ-инфекционный мононуклеоз тяжелой формы течения в острой фазе и после выздоровления, ВЭБ-ОС, ВЭБ-РС — ВЭБ-инфекционный мононуклеоз средней степени тяжести в острой фазе и после выздоровления, НОРМ — практически здоровые доноры.

A) The location of the samples in the coordinates of the first and second principal components with optical overlay of study groups. The ellipses represent the normal distribution of samples for each group. B) The location of the samples in the coordinates of the third and fourth principal components with optical overlay of study groups. C) The location of the samples in the coordinates of the first and second principal components with optical overlay of participants' gender. D) The location of the samples in the coordinates of the first and second principal components with optical overlay of participants' age. EBV-AS, EBV-RS — severe form of EBV-infectious mononucleosis in acute stage and after reconvalescence, EBV-AM, EBV-RM — moderate form of EBV-infectious mononucleosis in acute stage and after reconvalescence, NORM — healthy donors.

скрипты, экспрессия которых специфически изменялась при тяжелой форме ВЭБ-ИМ. Так, в крови пациентов с тяжелым течением заболевания выявлено повышение экспрессии генов BCL2L1, CELF6, SNRBP, а также снижение экспрессии генов BCL2L11, BIRC3, ELK1 и транскриптов SF1.NM\_201995 и XIAP.NM\_001167 по сравнению с практически здоровыми донорами. При ВЭБ-ИМ средней степени тяжести экспрессия указанных молекул не изменялась, за исключением гена ELK1 и транскрипта XIAP.NM\_001167, уровень представленности которых возрастал по сравнению с нормой (табл. 1, табл. 2–4 дополнительных материалов). Следует отметить, что выявленные изменения экспрессии маркерных молекул сохранялись и после выздоровления пациентов с тяжелой формой ВЭБ-ИМ (табл. 5 дополнительных материалов).

Нам также удалось выделить специфические маркеры ВЭБ-ИМ средней степени тяжести. В лейкоцитах крови пациентов с неосложненным течением заболевания наблюдали повышение экспрессии транскриптов FPGS.NM\_001018078 и PCNA.NM\_002592 по сравнению со здоровыми донорами. У пациентов с тяжелой формой ВЭБ-ИМ экспрессия этих мо-

лекул, наоборот, снижалась (табл. 1, табл. 2–4 дополнительных материалов). После выздоровления пациентов с ВЭБ-ИМ средней степени тяжести у них наблюдали нормализацию обоих показателей (табл. 6 дополнительных материалов).

*Исследование влияния пола пациента на экспрессию маркеров тяжелой формы течения ВЭБ-моноклеоза.* Поскольку разведывательный анализ данных показал возможное влияние пола на паттерн экспрессии изучаемых генов и транскриптов, мы провели сравнение экспрессии выявленных маркеров у пациентов с тяжелой формой ВЭБ-ИМ разного пола. Уровни экспрессии изучали в группах ВЭБ-ОТ и ВЭБ-РТ отдельно. При этом для сравнения использовали Т-тест с поправкой на множественные сравнения, а кратность изменения экспрессии FC рассчитывали как логарифм соотношения средних значений уровня экспрессии гена или транскрипта у пациентов мужского и женского пола по основанию 2.

В результате выявлено, что экспрессия маркеров ELK1 и SNRBP зависела от половой принадлежности пациентов. У пациентов мужского пола в острую фазу инфекции экспрессия ELK1 повышалась по сравнению с пациентами жен-

**Таблица 1. Экспрессия специфических маркеров тяжелой и среднетяжелой форм течения ВЭБ-инфекционного моноклеоза в лейкоцитах крови пациентов**

Table 1. Expression of specific markers of severe and moderate forms of EBV-infectious mononucleosis in patients' leukocytes

Маркер Marker	Изменение экспрессии в группах сравнения Change in expression in comparison groups					
	ВЭБ-ОТ — НОРМ EBV-AS — NORM		ВЭБ-ОС — НОРМ EBV-AM — NORM		ВЭБ-ОТ — ВЭБ-ОС EBV-AS — EBV-AM	
	FC; q	FI*	FC; q	FI*	FC; q	FI*
<b>Специфические маркеры тяжелой формы течения ВЭБ-инфекционного моноклеоза</b> Specific markers of severe form of EBV-infectious mononucleosis						
BCL2L1	2,04; q < 0,001	12,63	-1,32; q = 0,339	–	3,36; q < 0,001	0,00
BCL2L11	-4,40; q = 0,002	0,51	-1,08; q = 0,457	–	-2,99; q < 0,001	0,00
BIRC3	-3,62; q < 0,001	0,37	0,21; q = 0,571	–	-3,83; q < 0,001	0,00
CELF6	2,04; q < 0,001	0,02	-5,24; q = 0,092	–	7,28; q < 0,001	0,00
ELK1	-2,95; q < 0,001	0,20	1,04; q = 0,003	–	-3,99; q < 0,001	0,00
SF1.NM_201995	-3,45; q < 0,001	0,00	-0,38; q = 0,649	–	-3,07; q < 0,001	0,00
SNRBP	2,09; q < 0,001	0,49	-4,07; q = 0,369	–	6,16; q < 0,001	0,00
XIAP.NM_001167	-1,47; q < 0,001	2,47	1,67; q < 0,001	–	-3,12; q < 0,001	0,00
<b>Специфические маркеры ВЭБ-инфекционного моноклеоза средней степени тяжести</b> Specific markers of moderate form of EBV-infectious mononucleosis						
FPGS.NM_001018078	-1,16; q = 0,003	–	2,20; q < 0,001	6,66	-3,36; q < 0,001	0,00
PCNA.NM_002592	-0,92; q < 0,001	–	2,05; q < 0,001	6,24	-2,97; q < 0,001	0,00

**Примечание.** ВЭБ-ОТ — острый ВЭБ-инфекционный моноклеоз тяжелой формы течения, ВЭБ-ОС — острый ВЭБ-инфекционный моноклеоз средней степени тяжести, НОРМ — практически здоровые доноры. \*Для генов и транскриптов, не вошедших в список кандидатных маркеров соответствующей группы, значимость для классификации не указана.

Note. EBV-AS — severe form of acute EBV-infectious mononucleosis, EBV-AM — moderate form of EBV-infectious mononucleosis, NORM — healthy donors. \*For genes and transcripts not included in the list of candidate markers of the corresponding group, feature importance is not shown.

**Таблица 2. Экспрессия специфических маркеров тяжелой формы течения ВЭБ-инфекционного мононуклеоза в лейкоцитах крови пациентов разного пола**

Table 2. Expression of specific markers of severe form of EBV-infectious mononucleosis in the blood leukocytes of patients of different sexes

Маркер Marker	Изменение экспрессии у мужчин (n = 9) по сравнению с женщинами (n = 9): FC; значение q Change of expression in men (n = 9) compared with women (n = 9): FC; q-value	
	острая фаза инфекции acute infection	после выздоровления after recovery
BCL2L1	0,04; q = 0,615	-2,30; q < 0,001
BCL2L11	0,12; q = 0,445	0,03; q = 0,746
BIRC3	-0,11; q = 0,615	0,22; q = 0,312
CELF6	-0,13; q = 0,399	-0,25; q = 0,213
ELK1	0,986; q < 0,001	-0,80; q = 0,002
SF1.NM_201995	-0,02; q = 0,910	-0,16; q = 0,539
SNRPB	-0,30; q = 0,047	-0,52; q = 0,023
XIAP.NM_001167	-0,28; q = 0,399	0,22; q = 0,283

ского пола, а уровень экспрессии SNRPB, наоборот, снижался (табл. 2). После выздоровления пациентов мужского пола экспрессия обоих маркеров в крови снижалась по сравнению с пациентами женского пола. Следует отметить, что нами также выявлено снижение экспрессии гена BCL2L1 у мужчин по сравнению с женщинами, но только в стадии реконвалесценции. Кроме того, экспрессия гена BCL2L1 характеризовалась неравномерным распределением в группе практически здоровых доноров (об этом свидетельствовало высокое значение стандартного отклонения показателя по сравнению со средним, см. табл. 2, 3 дополнительных материалов), что также говорит о зависимости экспрессии гена от пола обследуемого либо иных неучитываемых факторов.

В связи с полученными данными, гены BCL2L1, ELK1 и SNRPB были исключены из перечня специфических маркеров тяжелой формы течения ВЭБ-инфекционного мононуклеоза.

## Обсуждение

На сегодняшний день накоплен значительный объем знаний о способности ВЭБ регулировать апоптоз и пролиферацию иммунокомпетентных клеток. Известно, что первичная острая ВЭБ-инфекция сопровождается пролиферацией пораженных В-лимфоцитов, а в условия *in vitro* и их иммортализацией [16]. При анализе транскриптома инфицированных В-клеток наблюдали изменение экспрессии групп генов, регулирующих митоз, клеточный цикл и p53-зависимый апоптоз. При этом индукция генов-участников NF-κB-сигнальных путей, как и NF-κB-зависимых генов, происходила на более поздних стадиях развития за-

болевания [17]. Похожие результаты получены при анализе генной экспрессии в периферической крови пациентов с ВЭБ-ИМ: наиболее активно экспрессирующиеся гены принадлежали к функциональной группе регуляторов клеточного цикла и участников IFN I-зависимого ответа [7]. Особенности генной экспрессии при тяжелых формах течения ВЭБ-инфекции в научной литературе не освещены.

В результате нашего исследования выявлен набор молекул — маркеров тяжелой формы течения ВЭБ-ИМ. Паттерн изменения экспрессии выделенных маркеров является специфическим для тяжелой формы течения заболевания, поскольку не наблюдается при ВЭБ-ИМ средней степени тяжести, а также не зависит от пола и возраста пациентов. По сравнению с практически здоровыми донорами, у пациентов с тяжелой формой течения ВЭБ-ИМ в крови выявлено снижение экспрессии генов BCL2L11, BIRC3, транскриптов SF1.NM\_201995 и XIAP.NM\_001167, а также усиление экспрессии гена CELF6. Выявленные маркеры относятся к двум функциональным группам: регуляторы апоптоза (BCL2L11, BIRC3, XIAP) и факторы сплайсинга пре-мРНК (CELF6, SF1).

Продукт гена BCL2L11 (BCL2 like 11, BAM, BIM, BOD), связываясь с другими белками семейства BCL2 на мембране митохондрий, обуславливает высвобождение цитохрома C и запуск митохондриального пути апоптоза. Известна способность ВЭБ подавлять экспрессию BCL2L11 в пораженных В-лимфоцитах, что обуславливает их выживание, усиленную пролиферацию и возможное злокачественное перерождение [20]. Описанный эффект связан с воздействием вирусных нуклеарных протеинов EBNA3A и EBNA3C, реализуется на ран-

них стадиях инфекции и не требует LMP-1-зависимой активации NF-κB [8, 15]. В нашем исследовании показано снижение экспрессии гена BCL2L11 более чем в 20 раз при развитии тяжелой формы ВЭБ-ИМ, что создает предпосылки для ингибирования митохондриального пути апоптоза и усиления экспансии пораженных вирусом иммунокомпетентных клеток.

Продукты других маркерных генов — BIRC3 и XIAP — обладают схожей способностью подавлять апоптоз, связываясь с адаптерами для рецептора фактора некроза опухоли TRAF-1 и TRAF-2. Дополнительно BIRC3 (baculoviral IAP repeat containing 3, API1, API2, MHC) является регулятором неканонического пути активации NF-κB. Снижение экспрессии BIRC3 при хроническом лимфолейкозе является плохим диагностическим признаком, поскольку сопровождается индукцией экспрессии NF-κB-зависимых генов и пролиферацией злокачественных клеток [4]. Вирусная микро-РНК ВЭБ miR-BHRF1-2 способна подавлять экспрессию BIRC3 в инфицированных клетках, хотя основными ее мишенями являются гены-участники IL-1-зависимого противовирусного иммунного ответа [19].

Продукт гена XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis, BIRC4, PI3, XLP2) — многофункциональный белок, участвующий в реализации антибактериального иммунитета и подавлении IL-1-индуцированного апоптоза в клетках иммунной системы. Генетические мутации гена, приводящие к снижению его экспрессии, являются одной из причин развития X-сцепленного лимфопролиферативного синдрома — наследственного расстройства иммунной системы с широким спектром клинических проявлений [21]. У пациентов с лимфопролиферативным синдромом развивается аномальный ответ на ВЭБ-инфекцию, сопровождающийся усилением цитотоксической активности и активационно-индуцированного апоптоза ВЭБ-специфических иммунных клеток [12, 18]. Наши результаты показывают, что снижение экспрессии транскрипта XIAP.NM\_001167 ассоциировано с тяжелым течением ВЭБ-ИМ даже у пациентов, не страдающих X-сцепленным лимфопролиферативным синдромом (ни у одного из пациентов не были зафиксированы клинические признаки синдрома; кроме того, в группу обследуемых были включены пациенты женского пола, не подверженные заболеванию). Следует отметить, что помимо снижения экспрессии транскрипта XIAP.NM\_001167, у пациентов с тяжелой формой ВЭБ-ИМ снижался уровень экспрессии другого транскрипта XIAP.NM\_001204401, а также самого гена XIAP (табл. 2 дополнительных материалов). Оба транскрипта XIAP кодируют один белок, однако изменение экспрессии маркерного транскрипта

было более выражено. Выявленное нами снижение экспрессии маркерных молекул BIRC3 и XIAP.NM\_001204401 может свидетельствовать об усилении TRAF-зависимого апоптоза иммунокомпетентных клеток при развитии тяжелой формы ВЭБ-инфекции.

Другие выявленные нами маркеры тяжелой формы течения ВЭБ-инфекции, являющиеся факторами сплайсинга (ген CELF6 и транскрипт SF1.NM\_201995), демонстрировали разнонаправленное изменение экспрессии при тяжелом ВЭБ-ИМ. Белок CELF6 (CUGBP Elav-like family member 6, BRUNOL6) экспрессируется преимущественно в тканях почек, головного мозга, сердца и печени, а в клетках крови представлен в незначительном количестве [11]. Значительное повышение экспрессии маркера в крови при тяжелой форме ВЭБ-инфекции может свидетельствовать как об активации нехарактерных для лейкоцитов крови механизмов сплайсинга пре-мРНК, так и о возникновении полиорганных поражений с вовлечением сердечно-сосудистой, выделительной, центральной и периферической нервной систем.

Фактор SF1 (splicing factor 1, BBP, MBBP, ZFM1) участвует в ранней сборке сплайсосомы и выборе альтернативных сайтов сплайсинга [6]. Высокий уровень экспрессии SF1 характерен для клеток костного мозга, лимфатических узлов, селезенки. Транскрипт SF1.NM\_201995 отличается от «основного» варианта мРНК SF1 отсутствием сегментов в 3'-нетранслируемом регионе и кодирующей части, что приводит к сдвигу рамки считывания и трансляции более короткого протеина с иной последовательностью аминокислот на С-конце. Длина С-конца SF1 влияет на его взаимодействие с другими компонентами сплайсосомы и обуславливает селекцию сайта сплайсинга [3, 5]. Выбор сайта сплайсинга определяет долю представленности различных транскриптов одного гена в клетке, тем самым регулируя функцию гена [2]. Таким образом, снижение экспрессии транскрипта SF1.NM\_201995 более чем в 10 раз при развитии тяжелой формы ВЭБ-ИМ может иметь важные, но пока не выясненные функциональные и клинически значимые последствия.

Необходимо отметить, что выраженные изменения экспрессии маркерных генов и транскриптов при тяжелой форме течения ВЭБ-ИМ сохранялись и после выздоровления пациентов. Полученный результат говорит о формировании длительных, стойких изменений отдельных структурно-функциональных элементов транскриптома в иммунокомпетентных клетках пациентов при тяжелой форме течения инфекции и определяет необходимость молекулярно-иммунологического мониторинга на стадии острой инфекции и после выздоровления.



## Заключение

Выявлен набор молекулярно-генетических маркеров тяжелой формы течения ВЭБ-инфекции. По сравнению с практически здоровыми донорами, у пациентов с тяжелой формой течения ВЭБ-инфекции в крови выявлено снижение экспрессии генов BCL2L11, BIRC3, транскриптов SF1.NM\_201995 и XIAP.NM\_001167, а также усиление экспрессии гена CELF6. Выявленные изменения экспрессии

маркеров специфичны для тяжелой формы заболевания, не проявляются при инфекции средней тяжести и не зависят от пола и возраста пациентов. Полученный набор маркеров можно использовать при разработке специфических средств прогнозирования рисков возникновения тяжелой формы течения ВЭБ-ИМ и молекулярно-иммунологического мониторинга на разных стадиях инфекционного процесса, а также в качестве перспективных мишеней для средств таргетной терапии.

## Список литературы/References

1. Солнцев Л.А., Старикова В.Д., Сахарнов Н.А., Князев Д.И., Уткин О.В. Стратегия подбора зондов для изучения совокупности мРНК участников рецептор-опосредованного сигналинга апоптоза // Молекулярная биология. 2015. Т. 49, № 3. С. 457–465. [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. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology*, 2015, vol. 49, no. 3, pp. 457–465. doi: 10.7868/S0026898415030167 (In Russ.)]
2. 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.)]
3. Arning S., Grüter P., Bilbe G., Krämer A. Mammalian splicing factor SF1 is encoded by variant cDNAs and binds to RNA. *RNA*, 1996, vol. 2, no. 8, pp. 794–810.
4. Asslaber D., Watch N., Leisch M., Qi Y., Maeding N., Hufnagl C., Jansko B., Zaborsky N., Villunger A., Hartmann T.N., Greil R., Egle A. BIRC3 expression predicts CLL progression and defines treatment sensitivity via enhanced NF-κB nuclear translocation. *Clin. Cancer Res.*, 2018, vol. 25, no. 6, pp. 1901–1912. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1548
5. Caslini C., Spinelli O., Cazzaniga G., Golay J., De Gioia L., Pedretti A., Breviario F., Amaru R., Barbui T., Biondi A., Introna M., Rambaldi A. Identification of two novel isoforms of the ZNF162 gene: a growing family of signal transduction and activator of RNA proteins. *Genomics*, 1997, vol. 42, no. 2, pp. 268–277. doi: 10.1006/geno.1997.4705
6. Corioni M., Antih N., Tanackovic G., Zavolan M., Krämer A. Analysis of in situ pre-mRNA targets of human splicing factor SF1 reveals a function in alternative splicing. *Nucleic Acids Res.*, 2011, vol. 39, no. 5, pp. 1868–1879. doi: 10.1093/nar/gkq1042
7. Dunmire S.K., Odumade O.A., Porter J.L., Reyes-Genere J., Schmeling D.O., Bilgic H., Fan D., Baechler E.C., Balfour H.H. Jr., Hogquist K.A. Primary EBV infection induces an expression profile distinct from other viruses but similar to hemophagocytic syndromes. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 1: e85422. doi: 10.1371/journal.pone.0085422
8. Fitzsimmons L., Boyce A.J., Wei W., Chang C., Croom-Carter D., Tierney R.J., Herold M.J., Bell A.I., Strasser A., Kelly G.L., Rowe M. Coordinated repression of BIM and PUMA by Epstein–Barr virus latent genes maintains the survival of Burkitt lymphoma cells. *Cell Death Differ.*, 2018, vol. 25, no. 2, pp. 241–254. doi: 10.1038/cdd.2017.150
9. Fu Q., He C., Mao Z. Epstein–Barr virus interactions with the Bcl-2 protein family and apoptosis in human tumor cells. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, 2013, vol. 14, no. 1, pp. 8–24. doi: 10.1631/jzus.B1200189
10. Houldcroft C.J., Kellam P. Host genetics of Epstein–Barr virus infection, latency and disease. *Rev. Med. Virol.*, 2015, vol. 25, no. 2, pp. 71–84. doi: 10.1002/rmv.1816
11. Ladd A.N., Nguyen H.N., Malhorta K., Cooper A. CELF6, a member of the CELF family of RNA-binding proteins, regulates muscle-specific splicing enhancer-dependent alternative splicing. *J. Biol. Chem.*, 2004, vol. 279, no. 17, pp. 17756–17764. doi: 10.1074/jbc.M310687200
12. Lopez-Granados E., Stacey M., Kienzler A.-K., Sierro S., Willberg C.B., Fox C.P., Rigaud S., Long H.M., Hislop A.D., Rickinson A.B., Patel S., Latour S., Klenerman P., Chapel H. A mutation in X-linked inhibitor of apoptosis (G466X) leads to memory inflation of Epstein–Barr virus-specific T cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 2014, vol. 178, no. 3, pp. 470–482. doi: 10.1111/cei.12427
13. McAulay K.A., Higgins C.D., Macsween K.F., Lake A., Jarrett R.F., Robertson F.L., Williams H., Crawford D.H. HLA class I polymorphisms are associated with development of infectious mononucleosis upon primary EBV infection. *J. Clin. Invest.*, 2007, vol. 117, no. 10, pp. 3042–3048. doi: 10.1172/JCI32377
14. Pender M.P. CD8<sup>+</sup> T-cell deficiency, Epstein–Barr virus infection, vitamin D deficiency, and steps to autoimmunity: a unifying hypothesis. *Autoimmune Dis.*, 2012, vol. 2012: 189096. doi: 10.1155/2012/189096
15. Price A.M., Dai J., Bazot Q., Patel L., Nikitin P.A., Djavadian R., Winter P.S., Salinas C.A., Barry A.P., Wood K.C., Johannsen E.C., Letai A., Allday M.J., Luftig M.A. Epstein–Barr virus ensures B cell survival by uniquely modulating apoptosis at early and late times after infection. *eLife*, 2017, vol. 6: e22509. doi: 10.7554/eLife.22509
16. Price A.M., Luftig M.A. Dynamic Epstein–Barr virus gene expression on the path to B-cell transformation. *Adv. Virus Res.*, 2014, vol. 88, pp. 279–313. doi: 10.1016/B978-0-12-800098-4.00006-4
17. Price A.M., Tourigny J.P., Forte E., Salinas R.E., Dave S.S., Luftig M.A. Analysis of Epstein–Barr virus-regulated host gene expression changes through primary B-cell outgrowth reveals delayed kinetics of latent membrane protein 1-mediated NF-κB activation. *J. Virol.*, 2012, vol. 86, no. 20, pp. 11096–11106. doi: 10.1128/JVI.01069-12

18. Rigaud S., Fondanèche M.-C., Lambert N., Pasquier B., Ateo V., Soulas P., Galicier L., Le Deist F., Rieux-Laucat F., Revy P., Fischer A., de Saint Basile G., Latour S. XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature*, 2006, vol. 444, no. 7115, pp. 110–114. doi: 10.1038/nature05257
19. Skinner C.M., Ivanov N.S., Barr S.A., Chen Y., Skalsky R.L. An Epstein–Barr virus microRNA blocks interleukin-1 (IL-1) signaling by targeting IL-1 receptor 1. *J. Virol.*, 2017, vol. 91, no. 21: e00530-17. doi: 10.1128/JVI.00530-17
20. Wood C.D., Veenstra H., Khasnis S., Gunnel A., Webb H.M., Shannon-Lowe C., Andrews S., Osborne C.S., West M.J. MYC activation and BCL2L1 silencing by a tumour virus through the large-scale reconfiguration of enhancer-promoter hubs. *eLife*, 2016, vol. 5: e18270. doi: 10.7554/eLife.18270
21. Worth A.J.J., Houldcroft C.J., Booth C. Severe Epstein–Barr virus infection in primary immunodeficiency and the normal host. *Br. J. Haematol.*, 2016, vol. 175, no. 4, pp. 559–576. doi: 10.1111/bjh.14339

---

**Авторы:**

**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;

**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;

**Кулова Е.А.**, к.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней Приволжского исследовательского медицинского университета, Нижний Новгород, Россия.

**Authors:**

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

**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;

**Kulova E.A.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Infectious Diseases Department, Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

---

Поступила в редакцию 13.09.2019  
Отправлена на доработку 15.01.2020  
Принята к печати 14.03.2020

---

Received 13.09.2019  
Revision received 15.01.2020  
Accepted 14.03.2020