

НОВЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МАРКЕР ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ ЧЕЛОВЕКА К ТЯЖЕЛЫМ ФОРМАМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

© 2019 г. А. В. Бархаш^a, *, И. В. Козлова^b, Л. Л. Позднякова^c,
Н. С. Юдин^a, М. И. Воевода^a, А. Г. Ромашенко^a

^aФедеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

^bНаучный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, 664003 Россия

^cГородская инфекционная клиническая больница № 1, Новосибирск, 630099 Россия

*e-mail: barkhash@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 03.10.2018 г.

После доработки 12.11.2018 г.

Принята к печати 14.11.2018 г.

Возбудитель клещевого энцефалита – нейротропный РНК-содержащий вирус из рода *Flavivirus* – может вызывать как тяжелые паралитические формы заболевания (менингоэнцефалитическая и др.), так и более легкие непаралитические (лихорадочная и менингеальная). Реакция организма на вирусную инфекцию (и, как следствие, характер течения и исход заболевания) в значительной степени зависит от индивидуальных особенностей защитных систем организма человека, предопределяемых структурой его генома. Генетическая предрасположенность человека к клещевому энцефалиту сравнительно мало изучена. В настоящей работе представлены результаты поиска новых генов, предопределяющих особенности течения и исход клещевого энцефалита у человека. Цель работы состояла в верификации существования связи между тремя выявленными ранее с помощью секвенирования экзомов на ограниченной выборке больных тяжелыми формами клещевого энцефалита SNP: rs3109675 (С/Т) в инtronе гена *COL5A1*, rs41554313 (А/Г) в инtronе гена *POLRMT* и межгенового rs10006630 (С/А), и предрасположенностью к клещевому энцефалиту в популяции русских (с использованием расширенной выборки больных с различными формами клещевого энцефалита). Подтверждена ассоциация SNP rs10006630, локализованного на хромосоме 4 между генами *FABP2* и *LINC01061*, с предрасположенностью к клещевому энцефалиту. Этот SNP можно рассматривать как новый генетический маркер предрасположенности человека к тяжелым формам клещевого энцефалита. Возможная регуляторная роль этого SNP в функционировании близлежащих генов и механизм его влияния на формирование предрасположенности к тяжелым формам клещевого энцефалита требуют дальнейшего изучения.

Ключевые слова: клещевой энцефалит, генетическая предрасположенность, однонуклеотидный полиморфизм

DOI: 10.1134/S0026898419020034

ВВЕДЕНИЕ

Клещевой энцефалит (КЭ) вызывается РНК-содержащим вирусом из рода *Flavivirus*, распространенным на территории России и в ряде европейских и азиатских стран. Ежегодно регистрируется до 14000 случаев заболевания КЭ, в том числе от 2000 до 11000 в России. Несмотря на то, что вирус КЭ является нейротропным и может вызывать тяжелые паралитические (очаговые) формы заболевания с поражением центральной нервной системы (ЦНС) (менингоэнцефалитическая и др.), значительно чаще встречаются непаралитические формы КЭ (лихорадочная и менингеаль-

ная), примерно в 70–95% случаев заболевание протекает бессимптомно [1–3]. Известно, что реакция организма на воздействие вируса (и, как следствие, особенности течения и исход заболевания) в значительной степени зависит от индивидуальных особенностей генома человека, предопределяющих способность его иммунной системы подавлять развитие вирусной инфекции [4, 5].

Генетическая предрасположенность человека к КЭ еще сравнительно мало изучена [6]. Используя анализ генов-кандидатов, мы впервые показали, что однонуклеотидные полиморфизмы (single nucleotide polymorphisms, SNP) в генах *OAS2*,

Сокращения: КЭ – клещевой энцефалит; ЦНС – центральная нервная система; SNP – single nucleotide polymorphism (однонуклеотидный полиморфизм).

Таблица 1. Параметры генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов (SNP)

Ген, SNP	Праймер, нуклеотидная последовательность	T_m , °C	ПЦР-продукт, п.н.	Эндонуклеаза рестрикции	Длина рестрикционных фрагментов, п.н.
<i>COL5A1</i> rs3109675	5'-GAGCCCCATGATGCCGC-3 ^a 5'-CAGCTCCCCGTCGGAGATCG-3'	60	125	HspAI	C/C: 108, 17 C/T: 125, 108, 17 T/T: 125
<i>POLRMT</i> rs41554313	5'-ACTGCTGGCACTGACTTTACCCGC-3' 5'-GCCCTCCCAGGACCCGG-3 ^a	62	117	SmaI	G/G: 101, 16 G/A: 117, 101, 16 A/A: 117
rs10006630	5'-GGTATGAAATAGTTAGTTATGCG-3 ^a 5'-AATTGGAACAAAGCAAGAAC-3'	55	146	HspAI	C/C: 123, 23 C/A: 146, 123, 23 A/A: 146

T_m – температура отжига праймеров. ^a Нуклеотиды, выделенные жирным шрифтом, заменены в структуре праймера для образования нового сайта узнавания эндонуклеазой рестрикции [13].

OAS3, *CD209*, *TLR3*, *IL28B* и *IL10*, кодирующих ключевые компоненты неспецифического иммунного ответа, ассоциированы с предрасположенностью к КЭ у русских жителей Новосибирска [7–10]. Кроме того, методом полноэкзомного секвенирования с последующим подтверждением полученных данных ассоциативным анализом на выборках большего размера мы показали, что SNP генов *MMP9*, *ABCB9* и *COL22A1* также являются вероятными генетическими маркерами предрасположенности к КЭ в популяции русских [11, 12]. В настоящей работе представлены результаты поиска новых генов, предопределяющих особенности течения и исход КЭ у человека. Целью данной работы была верификация (на расширенной выборке больных с различными формами КЭ) существования связи между тремя SNP: rs3109675 (С/Т) в инtronе гена *COL5A1*, rs41554313 (А/Г) в инtronе гена *POLRMT* и межгенного rs10006630 (С/А), выявленными с помощью секвенирования экзомов на ограниченной выборке больных тяжелыми формами КЭ [12], и предрасположенностью к КЭ у русских.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пациенты. В работе использовали 169 образцов ДНК, выделенных из крови неродственных русских больных КЭ, проходивших лечение в стационарах Новосибирска в 2002–2017 гг. ($n = 139$) и Иркутска в 2014–2017 гг. ($n = 30$). Все пациенты имели диагноз КЭ, подтвержденный согласно общепринятым критериям (клиническая картина, анализ спинномозговой жидкости, серологическая диагностика, сезонность, факт укуса клещом) [1]. Проведение исследования одобрено Комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН. Все пациенты дали письменное информированное согласие на участие в обследо-

вании. В исследование были включены только пациенты, которые не подвергались иммунизации до начала заболевания (профилактической вакцинации и/или введению специфического иммуноглобулина после укуса клеща). Общая группа больных была разделена на подгруппы в соответствии с клиническими формами КЭ: 1) тяжелые формы с поражением ЦНС (менингоэнцефалитическая, полиомиелитическая, полиоэнцефаломиелитическая) ($n = 61$); 2) более легкие формы без поражения ЦНС ($n = 108$) – лихорадочная ($n = 47$) и менингальная ($n = 61$).

Контроль. Образцы ДНК контрольной группы были собраны в Новосибирске и Иркутске. Контрольная группа Новосибирска ($n = 115$), которая включала русских, отобранных случайным образом из избирательных списков одного из районов, была собрана в 1993–1994 гг. в рамках программы ВОЗ “MONICA” (MONItoring trends and determinants in CArdiovascular disease). Контрольная группа Иркутска включала 100 случайно отобранных русских доноров крови. Информация о реакции лиц, включенных в контрольную группу, на заражение вирусом КЭ отсутствовала.

Генотипирование. Генотипирование SNP rs3109675 гена *COL5A1*, rs41554313 гена *POLRMT* и межгенного SNP rs10006630 проводили методом ПЦР с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Для генотипирования по каждому из SNP были подобраны пары праймеров, при этом в одном из праймеров была произведена замена нуклеотида согласно [13] для введения нового сайта рестрикции в ПЦР-продукт. Основные параметры генотипирования по изученным SNP приведены в табл. 1. Размеры продуктов ПЦР и рестрикционных фрагментов определяли с помощью электрофореза в 5–6%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) и окрашивания раствором бромистого этидия.

Таблица 2. Частоты генотипов и аллелей по изученным SNP у больных различными формами клещевого энцефалита и в контрольной популяционной группе

Ген, SNP, генотипы и аллели	Частота генотипа/аллеля, % (количество ^a)						P	
	контроль	Больные КЭ						
		всего	формы без поражения ЦНС			тяжелые формы с поражением ЦНС		
			всего	ЛФ	МФ			
<i>COL5A1</i> , rs3109675								
T/T	32.5 (70)	31.1 (51)	31.7 (33)	30.4 (14)	32.8 (19)	30.0 (18)	>0.05	
T/C	47.0 (101)	51.2 (84)	51.0 (53)	52.2 (24)	50.0 (29)	51.7 (31)	>0.05	
C/C	20.5 (44)	17.7 (29)	17.3 (18)	17.4 (8)	17.2 (10)	18.3 (11)	>0.05	
T	56.0	56.7	57.2	56.5	57.8	55.8	>0.05	
C	44.0	43.3	42.8	43.5	42.2	44.2	>0.05	
N	215	164	104	46	58	60		
χ^2 HW	0.47							
<i>POLRMT</i> , rs41554313								
G/G	81.8 (171)	77.5 (131)	74.1 (80)	72.4 (34)	75.4 (46)	83.6 (51)	>0.05	
G/A	16.3 (34)	20.7 (35)	24.1 (26)	25.5 (12)	23.0 (14)	14.8 (9)	>0.05	
A/A	1.9 (4)	1.8 (3)	1.8 (2)	2.1 (1)	1.6 (1)	1.6 (1)	>0.05	
G	90.0	87.9	86.1	85.1	86.9	91.0	>0.05	
A	10.0	12.1	13.9	14.9	13.1	9.0	>0.05	
N	209	169	108	47	61	61		
χ^2 HW	2.09							
Межгенный, rs10006630								
A/A	43.4 (92)	36.6 (60)	38.7 (41)	43.5 (20)	35.0 (21)	32.7 (19)	>0.05	
A/C	48.6 (103)	51.2 (84)	52.8 (56)	43.5 (20)	60.0 (36)	48.3 (28)	>0.05	
C/C	8.0 (17) ^b	12.2 (20)	8.5 (9)	13.0 (6)	5.0 (3) ^c	19.0 (11) ^{b, c}	0.016 ^b , 0.02 ^c	
A	67.7	62.2	65.1	65.2	65.0	56.9	>0.05	
C	32.3	37.8	34.9	34.8	35.0	43.1	>0.05	
N	212	164	106	46	60	58		
χ^2 HW	2.6							

Примечание. КЭ – клещевой энцефалит; ЦНС – центральная нервная система; ЛФ – лихорадочная форма; МФ – менингейальная форма; N – размер выборки; P – уровень значимости при сравнении частот генотипов и аллелей в группах; χ^2 HW – значения теста χ^2 на соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга. ^a Количество человек с данным генотипом. ^b Уровень значимости при сравнении больных тяжелыми формами КЭ с поражением ЦНС и контрольной группой. ^c Уровень значимости при сравнении больных тяжелыми формами КЭ с поражением ЦНС и больных с МФ КЭ.

Статистические методы. Соответствие частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга оценивали с использованием критерия χ^2 и компьютерной программы CHIHW [14]. Сравнение частот генотипов и аллелей в изученных группах проводили по критерию χ^2 с помощью программы SPSS (версия 11.0). Различия между группами считали статистически значимыми при уровне значимости $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Три SNP, включая rs3109675 гена *COL5A1*, rs41554313 гена *POLRMT* и межгенный rs10006630, были выбраны нами в качестве потенциальных новых генетических маркеров предрасположенности человека к тяжелым формам КЭ по результатам полноэкзонного секвенирования [12]. Перечис-

ленные полиморфизмы относятся к тем 16 SNP, частоты генотипов и/или аллелей которых различаются в группах больных тяжелыми формами КЭ и в контрольной группе [12].

Частоты генотипов и аллелей у больных КЭ, включая подгруппы с тяжелыми формами с поражением ЦНС и более легкими формами (лихорадочная и менингейальная), а также в контрольной группе, представлены в табл. 2. Распределение частот генотипов в контрольной популяционной группе по каждому из изученных SNPs соответствовало равновесию Харди–Вайнберга. Не найдено статистически значимых отличий в частотах генотипов и аллелей SNP rs3109675 гена *COL5A1* и rs41554313 гена *POLRMT* в общей группе больных КЭ и в контрольной группе, а также между подгруппами больных тяжелыми и более легкими формами КЭ и/или контролем. Обнаружено ста-

тистически значимое повышение частоты генотипа С/С по SNP rs10006630 у больных тяжелыми формами КЭ (19.0%) по сравнению с контрольной группой (8.0%) ($P = 0.016$) и больными с более легкой менингеальной формой КЭ (5.0%) ($P = 0.02$).

Ассоциация только одного из трех изученных нами SNP с предрасположенностью к тяжелым формам КЭ была подтверждена при верификации на расширенной выборке образцов больных КЭ. Согласно нашим данным, SNP генов *COL5A1* (кодирует α -цепь коллагена типа 5 [15]) и *POLRMT* (кодирует митохондриальную РНК-полимеразу [16]), не связаны с изучаемым признаком. Принимая во внимание ранее полученные нами данные [11, 12], можно заключить, что полноэкзонное секвенирование ограниченной выборки образцов ДНК позволяет сократить набор искомых SNP, но требует обязательной дальнейшей верификации. SNP rs10006630 локализован на хромосоме 4 в промежутке между двумя известными генами – на расстоянии около 22 т.п.н. от сайта инициации транскрипции гена *FABP2* (кодирует белок, связывающий жирные кислоты [17]) и на расстоянии около 61 т.п.н от гена *LINC01061* (продукт которого относится к некодирующему РНК). Поскольку основы архитектоники кодирующих и регуляторных частей генов пока не до конца выяснены, на данный момент SNP rs10006630 можно рассматривать как новый генетический маркер предрасположенности человека к развитию тяжелых форм КЭ. Опубликованных сведений об этом SNP нами не найдено. Возможная регуляторная роль этого SNP в функционировании близлежащих генов *FABP2* и *LINC01061* и механизм его влияния на формирование предрасположенности к тяжелым формам КЭ требуют дальнейшего изучения.

Таким образом, в данной работе идентифицирован SNP (rs10006630), связанный с предрасположенностью к тяжелым формам КЭ в популяции русских. Для определения возможного механизма защитных реакций с участием этого межгенового SNP необходимы дальнейшие исследования.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (№ 16-15-00127).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gritsun T.S., Lashkevich V.A., Gould E.A. (2003) Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res.* **57**, 129–146.
2. Ruzek D., Dobler G., Donoso Mantke O. (2010) Tick-borne encephalitis: pathogenesis and clinical implications. *Travel. Med. Infect. Dis.* **8**, 223–232.
3. Bogovic P., Strle F. (2015) Tick-borne encephalitis: a review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *World J. Clin. Cases.* **3**, 430–441.
4. Chapman S.J., Hill A.V. (2012) Human genetic susceptibility to infectious disease. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 175–188.
5. Loeb M. (2013) Host genomics in infectious diseases. *Infect. Chemother.* **45**, 253–259.
6. Юдин Н.С., Бархаш А.В., Максимов В.Н., Игнатьева Е.В., Ромашенко А.Г. (2018) Генетическая предрасположенность человека к заболеваниям, вызываемым вирусами семейства Flaviviridae. *Молекуляр. биология*. **52**, 190–209.
7. Barkhash A.V., Perelygin A.A., Babenko V.N., Myasnikova N.G., Pilipenko P.I., Romaschenko A.G., Voevoda M.I., Brinton M.A. (2010) Variability in the 2'-5'-oligoadenylate synthetase gene cluster is associated with human predisposition to tick-borne encephalitis virus-induced disease. *J. Infect. Dis.* **202**, 1813–1818.
8. Barkhash A.V., Perelygin A.A., Babenko V.N., Brinton M.A., Voevoda M.I. (2012) Single nucleotide polymorphism in the promoter region of the *CD209* gene is associated with human predisposition to severe forms of tick-borne encephalitis. *Antiviral Res.* **93**, 64–68.
9. Barkhash A.V., Voevoda M.I., Romaschenko A.G. (2013) Association of single nucleotide polymorphism rs3775291 in the coding region of the *TLR3* gene with predisposition to tick-borne encephalitis in a Russian population. *Antiviral Res.* **99**, 136–138.
10. Barkhash A.V., Babenko V.N., Voevoda M.I., Romaschenko A.G. (2016) Association of *IL28B* and *IL10* gene polymorphism with predisposition to tick-borne encephalitis in a Russian population. *Ticks Tick-Borne Dis.* **7**, 808–812.
11. Barkhash A.V., Yurchenko A.A., Yudin N.S., Ignat'eva E.V., Kozlova I.V., Borishchuk I.A., Pozdnyakova L.L., Voevoda M.I., Romaschenko A.G. (2018) A matrix metalloproteinase 9 (*MMP9*) gene single nucleotide polymorphism is associated with predisposition to tick-borne encephalitis virus-induced severe central nervous system disease. *Ticks Tick-Borne Dis.* **9**, 763–767.
12. Бархаш А.В., Юрченко А.А., Юдин Н.С., Козлова И.В., Борищук И.А., Смольникова М.В., Зайцева О.И., Позднякова Л.Л., Воевода М.И., Ромашенко А.Г. (2019) Связь полиморфизма генов *ABC9* и *COL22A1* с предрасположенностью человека к тяжелым формам клещевого энцефалита. *Генетика*. **55**, принята к печати.
13. Neff M.M., Turk E., Kalishman M. (2002) Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis. *Trends Genet.* **18**, 613–615.
14. Zaykin D.V., Pudovkin A.I. (1993) Two programs to estimate significance of χ^2 values using pseudo-probability tests. *J. Hered.* **84**, 152.
15. Greenspan D.S., Byers M.G., Eddy R.L., Cheng W., Jani-Sait S., Shows T.B. (1992) Human collagen gene *COL5A1* maps to the q34.2–q34.3 region of chromosome 9, near the locus for nail-patella syndrome. *Genomics*. **12**, 836–837.
16. Barshad G., Marom S., Cohen T., Mishmar D. (2018) Mitochondrial DNA transcription and its regulation: an evolutionary perspective. *Trends Genet.* **34**, 682–692.
17. Thumser A.E., Moore J.B., Plant N.J. (2014) Fatty acid binding proteins: tissue-specific functions in health and disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **17**, 124–129.

NEW GENETIC MARKER OF HUMAN PREDISPOSITION TO SEVERE FORMS OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS

**A. V. Barkhash¹, *, I. V. Kozlova², L. L. Pozdnyakova³, N. S. Yudin¹,
M. I. Voevoda¹, and A. G. Romaschenko¹**

¹*Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch,
Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

²*Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, 664003 Russia*

³*City Infectious Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, 630099 Russia*

*e-mail: barkhash@bionet.nsc.ru

The causative agent of tick-borne encephalitis (neurotropic RNA virus from the *Flavivirus* genus) can cause both severe paralytic forms of the disease (meningoencephalitis, etc.) and milder non-paralytic forms (fever and meningitis). The organism response to viral infection (and, as a consequence, the nature and outcome of the disease) significantly depends on individual peculiarities of the human organism protective systems predetermined by the structure of his genome. Human genetic predisposition to tick-borne encephalitis is relatively poorly studied. In the present work, the results of the search for new genes that predetermine the peculiarities and outcome of tick-borne encephalitis in humans are presented. The aim of the work was to verify the existence of association between three previously detected using the exome sequencing on a limited sample of tick-borne encephalitis patients with severe forms SNPs: rs3109675 (C/T) in the *COL5A1* gene intron, rs41554313 (A/G) in the *POLRMT* gene intron, and intergenic rs10006630 (C/A), and predisposition to tick-borne encephalitis in a Russian population (using the extended sample of patients with different forms of tick-borne encephalitis). The association of the rs10006630 SNP located in the chromosome 4 between the *FABP2* and *LINC01061* genes with predisposition to tick-borne encephalitis was confirmed. This SNP can be considered as a new genetic marker of human predisposition to severe forms of tick-borne encephalitis. A possible regulatory role of this SNP in the functioning of neighboring genes and a mechanism of its effect on the development of predisposition to severe forms of tick-borne encephalitis require further study.

Keywords: tick-borne encephalitis, genetic predisposition, single nucleotide polymorphism